Zur Kenntnis enzymatischer Vorgänge in Kakaobohnen, besonders im Hinblick auf die Bildung von Aromen und Aromavorstufen

von

HARTMUT MORCINEK

1962

Zur Kenntnis enzymatischer Vorgänge in Kakaobohnen, besonders im Hinblick auf die Bildung von Aromen und Aromavorstufen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt

von

Hartmut Morcinek

aus

Ratibor

Mai 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. R. Springer
2. Prof. Dr. E. Bamann
Tag der mündlichen Prüfung: 20. 6. 1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Meiner lieben Mutter

und

dem Andenken meines Vaters

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. SPRINGER angefertigt. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte von 1958 - 1961 am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V., München (Direktor: Prof. Dr.Ing. R. HEISS).

Herrn Prof. Dr. R. SPRINGER danke ich für die stete Anteilnahme und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte. Für das großzügige Entgegenkommen durch die Aufnahme in sein Institut, die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Genehmigung zur Benützung der Einrichtungen bin ich Herrn Prof. Dr.Ing. R. HEISS sehr verpflichtet.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr.Ing. A. PURR, Chefchemiker am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V., für seinen Rat bei allen auftauchenden Fragen und die wertvollen Hinweise, die er mir stets zuteil werden liess. Seine reichen Erfahrungen auf dem Gebiete der Enzymchemie vermittelten mir mannigfache Anregungen.

Herrn Prof. Dr. E. BAMANN, Direktor des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, möchte ich für die Förderung während meines Studiums an der Universität München und die Unterstützung meiner Arbeit, sowie für das Wohlwollen, das er mir persönlich jederzeit entgegengebracht hat, ergebenst danken.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A BEITRÄGE ZUR KENNTNIS ENZYMATISCHER VORGÄNGE IN KAKAOBOHNEN 1

I EINFÜHRUNG 1

II ERMITTELUNG DER AKTIVITÄT VON ENZYMEN IN RUHENDEN UND GEKEIMTEN KAKAOBOHNEN, SOWIE AUFFINDEN VON BISHER NOCH NICHT NACHGEWIESENEN ENZYMEN 2

Die einzelnen Enzyme:

1) Amylase 2
2) Proteinase 4
3) Lipase 6
4) Phosphatase 8
5) Pektinesterase 1o
6) Polygalakturonase 12
7) Katalase 13
8) Peroxydase 15
9) Polyphenoloxydase 18
1o) α-Decarboxylase 24
11) Coenzym A 28

III GEKOPPELTE REAKTIONEN ZWISCHEN DEN PRIMÄREN OXYDATIONSPRODUKTEN DER POLYPHENOLOXYDASE UND EIWEISSABBAUPRODUKTEN 31

B DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE 4o

C ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 49

D ANORDNUNG DER VERSUCHE 51

Herstellung der Enzymsuspension 51
Gewinnung der Enzymextrakte 51
Bereitung eines Acetontrockenpulvers 51
Ausführung der Bestimmungen:
1) Lochtest-Methode 51
a) Amylase 52
b) Proteinase 52
c) Lipase 52

Seite

d) Phosphatase 52
e) Pektinesterase 52
f) Polygalakturonase 52
2) Manometrische Bestimmung der Pektinesterase 52
3) Viskosimetrische Bestimmung der Polygalakturonase . 53
4) Manometrische Bestimmung der Katalase 54
5) Maßanalytische Bestimmung der Peroxydase 55
6) Manometrische Bestimmung der Polyphenoloxydase 56
7) Manometrische Bestimmung der α-Decarboxylase 56
8) Spektrophotometrische Bestimmung des Coenzym A 56

E LITERATURVERZEICHNIS 6o

A BEITRÄGE ZUR KENNTNIS ENZYMATISCHER VORGÄNGE IN KAKAOBOHNEN

I EINFÜHRUNG

Die bisherigen Kenntnisse über das Vorkommen von Enzymen in Kakaobohnen sind lückenhaft und es bestehen berechtigte Zweifel an ihrer Richtigkeit. Es wird daher für das Studium der Vorgänge bei der Kakaoaufbereitung insbesondere im Hinblick auf die Aromabildung als notwendig erachtet, zunächst eine Übersicht über das Vorhandensein der Enzyme in unfermentierten Kakaobohnen zu gewinnen.

Die vorliegende Untersuchung gilt im einzelnen der Klärung folgender Probleme:

1.) Der Bestätigung des Vorhandenseins und der Ermittelung der Aktivität bereits vor längerer Zeit vornehmlich von H.C. BRILL(8) und C. CIFERRI(9) in den Kakaobohnen festgestellter Enzyme mit Hilfe neuerer Methoden.
2.) Der Feststellung bisher im Kakao nicht aufgefundener Enzyme.
3.) Welche Aktivitätsunterschiede in ungekeimten und keimenden Kakaobohnen auftreten.
4.) Der Frage, ob durch solche enzymatische Prozesse Voraussetzungen für den Ablauf gekoppelter Reaktionen geschaffen werden und inwieweit
5.) solche Vorgänge einen Einblick in die Aromabildung bzw. Bildung von Aromavorstufen gewinnen lassen.

Das besondere Augenmerk wird den beiden letzten, von anderen Autoren bisher nicht diskutierten Fragen zugewandt. Es ist hierbei an Reaktionen gedacht, bei denen in der Kakaobohne bereits vorhandene Inhaltsstoffe mit Produkten enzymatischer Tätigkeit reagieren oder bei denen Spaltprodukte verschiedener Enzymsysteme in Wechselwirkung treten. Derartige Reaktionen sind sowohl zwischen Eiweißabbauprodukten und Oxydationsprodukten der Polyphenoloxydase als auch zwischen Produkten der Transaminierung und Decarboxylierung denkbar.

II ERMITTELUNG DER AKTIVITÄT VON ENZYMEN IN RUHENDEN UND GEKEIMTEN KAKAOBOHNEN, SOWIE AUFFINDEN VON BISHER NOCH NICHT NACHGEWIESENEN ENZYMEN

Zur Auffindung von Enzymen im Kakao und zur Durchführung halbquantitativer Bestimmungen erweist sich die Lochtest-Methode nach J. DINGLE, W. REID und G.L. SOLOMONS(11), im angelsächsischen Schrifttum als "cup-plate-Methode" bekannt, für die Aktivitätsbestimmung der Amylase, Lipase, Proteinase und der sauren sowie alkalischen Phosphatase als geeignet. Die Anwesenheit der nachfolgend beschriebenen Enzyme kann auf diese Weise nachgewiesen werden.

1) Amylase

Die Amylase ist bereits von H.C. BRILL(8) und C. CIFERRI(9) in frischen, unfermentierten Kakaobohnen gefunden worden. Über die dort erhobenen Befunde hinaus konnte festgestellt werden, daß die Aktivität im Verlaufe der Keimung stark zunimmt und zwar in der Art, daß bei einer Keimlingslänge von 1,8 cm, nachgewiesen mit oben erwähnter Methode, die Wandstärke des Ringes um das 2 1/2fache wächst (Tabelle I und Abb.1). Interessant ist, daß in Keimlingen etwa die gleiche Aktivität vorliegt wie in den gesamten, gekeimten Bohnen (Tabelle I).

Tabelle I
Vergleich der Aktivität von Amylase ungekeimter und angekeimter Kakaobohnen sowie Keimlingen

Extraktmenge ml	Wandstärke des Ringes cm		
	Kakaobohnenextrakt 1:1o		Keimlingsextrakt 1:1o
	ungekeimt	angekeimt (Keimlingslänge 1,8 cm)	
o,o5	o,3	o,5	o,45
o,1	o,5	o,7	o,65

Herkunftsland: Ghana

Abb. 1a

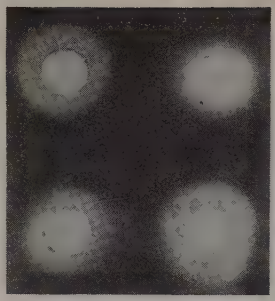


Abb. 1b

Abb. 1
Amylase-Aktivität a) in ungekeimten Kakaobohnen, b) in angekeimten Kakaobohnen, Keimlingslänge 1,8 cm, aus Ghana
(Versuchsansatz: Substrat o,5%ige lösliche Stärke in o,2m McIlvaine-Puffer, p_H 4,5, Entwickler o,oln Jodlösung, o,o5 bzw. o,1 ml Kakaobohnenextrakt 1:lo, Reaktionstemperatur 37°C, Reaktionsdauer 24 Std.)
Konzentrationen: oben o,o5 ml Extrakt
unten o,1 ml Extrakt

2) Proteinase

Bisher ist ein Nachweis von Proteinase in überzeugender Weise in Kakaobohnen aus Gründen, die in der Diskussion dargelegt werden, noch nicht geglückt. Mit Hilfe der Lochtest-Methode gelingt der Nachweis in eindeutiger Weise(Tabelle II und Abb.2).

Bei Cerealien beobachteten vergleichsweise A. BACH, A. OPARIN und R. WÄHNER(2) einen merklichen Anstieg der proteolytischen Aktivität während der Keimung. Über eine erhöhte enzymatische Proteinspaltung im Getreidekeimling berichten M. ROHRLICH und R. RASMUS(4o).

Tabelle II
Vergleich der Aktivität von Proteinase ungekeimter und angekeimter Kakaobohnen sowie Keimlingen

Extraktmenge ml	Wandstärke des Ringes cm		
	Kakaobohnenextrakt 1:1o		Keimlingsextrakt 1:1o
	ungekeimt	angekeimt (Keimlingslänge 1,3 cm)	
o,o5	o,1	o,2	o,15
o,1	o,2	o,35	o,25

Herkunftsland: Ghana

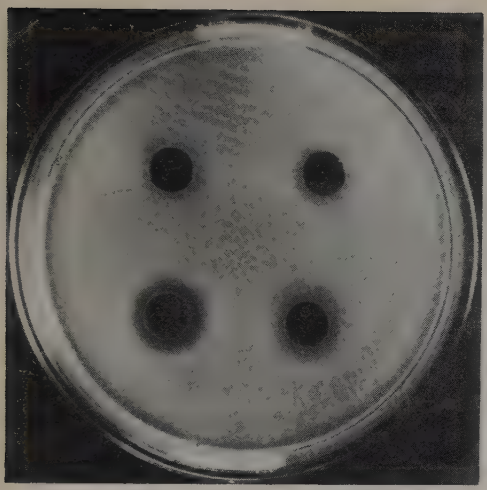


Abb. 2a

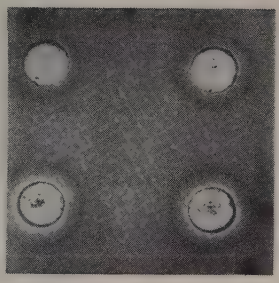


Abb. 2b

Abb. 2
Proteinase-Aktivität a) in ungekeimten Kakaobohnen, b) in angekeimten Kakaobohnen, Keimlingslänge 1,3 cm, aus Ghana
(Versuchsansatz: Substrat o,5%ige Gelatine in o,2m McIlvaine-Puffer, p_H 4,5, Entwickler 2o%ige Sulfosalicylsäure, o,o5 bzw. o,1 ml Kakaobohnenextrakt 1:1o, Reaktionstemperatur 37°C, Reaktionsdauer 24 Std.)
Konzentrationen: oben o,o5 ml Extrakt
unten o,1 ml Extrakt

3) Lipase

Bei einem fettreichen Samen mit 53,3% Fett i.T. ist die Anwesenheit einer Lipase-Aktivität zu erwarten. Kenntnisse in dieser Richtung liegen bei Kakaobohnen nicht vor. Mit Hilfe vorliegender Methode konnte erstmalig dieses Ferment in Kakaobohnen nachgewiesen werden.

Die Aktivität der Lipase nimmt bei einer Keimlingslänge von 0,8 cm stark zu. Aktivitätsunterschiede bei verschiedenen Enzymkonzentrationen treten jedoch, mutmaßlich methodisch bedingt, nicht auf (Abb.3). Ebenso lassen Keimlinge keine höhere Aktivität erkennen (Tabelle III).

Tabelle III
Vergleich der Aktivität von Lipase ungekeimter und angekeimter Kakaobohnen sowie Keimlingen

Extraktmenge ml	Wandstärke des Ringes cm		
	Kakaobohnenextrakt 1:10		Keimlingsextrakt 1:10
	ungekeimt	angekeimt (Keimlingslänge 0,8cm)	
0,05	0,2	0,35	0,2
0,1	0,2	0,35	0,2

Herkunftsland: Ghana

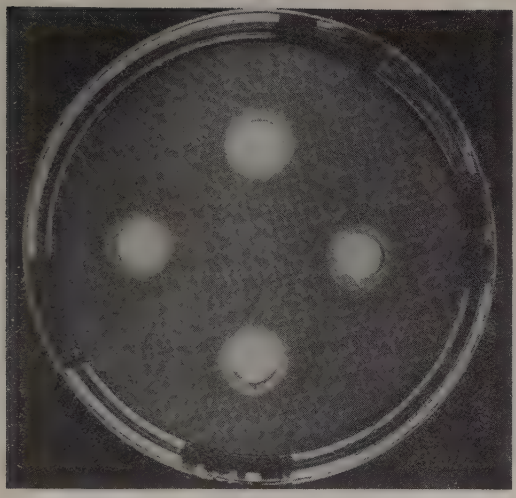


Abb. 3
Lipase-Aktivität in ungekeimten Kakaobohnen aus Ghana (Versuchsansatz: Substrat 0,5%iges Kokosfett in Acetatpuffer, p_H 5,0, Entwickler Kupferacetatlösung 10%ig, 0,05 bzw. 0,1 ml Kakaobohnenextrakt 1:10, Reaktionstemperatur 37°C, Reaktionsdauer 24 Std.).

4) Phosphatase

Es konnte kein Hinweis dafür gefunden werden, daß die Lochtest-Methode bereits anderwärts zum Nachweis von Phosphatasen herangezogen wurde. In Testversuchen erweist sich als Substrat Phenolphthaleindiphosphat als geeignet. Als Anordnung des Versuches wird die im Versuchsteil und unter Abb. 4a und 4b beschriebene Arbeitsvorschrift ermittelt. Der Nachweis gelingt in eindeutiger Weise.

Das hier wiedergegebene Schwarz-Weiß-Photo läßt die Wandstärke des Ringes nicht so deutlich erkennen, wie es die farbigen Konturen bei direkter Betrachtung des Versuchsansatzes gestatten.

Tabelle IV
Vergleich der Aktivität saurer und alkalischer Phosphatase ungekeimter und angekeimter Kakaobohnen

Kakaobohnen-Extrakt 1:10 ml	Wandstärke des Ringes cm			
	saure Phosphatase		alkalische Phosphatase	
	ungekeimt	angekeimt (Keimlingslänge 0,3cm)	ungekeimt	angekeimt (Keimlingslänge 0,3 cm)
0,05	0,1	0,2	0,05	0,1
0,1	0,2	0,3	0,10	0,2

Herkunftsland: Costarica

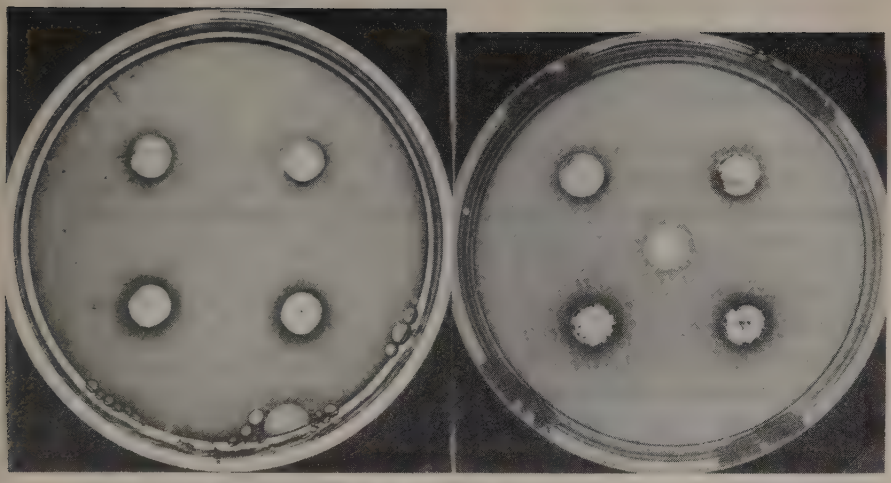


Abb. 4a

Abb. 4b

Abb. 4
Aktivität a) alkalischer Phosphatase in ungekeimten Kakaobohnen,
b) saurer Phosphatase in angekeimten Kakaobohnen, Keimlingslänge 0,3 cm
aus Costarica
(Versuchsansatz: Substrat 0,5%iges Phenolphthaleindiphosphat in Acetatpuffer, p_H 5,0, Entwickler Ammoniakdämpfe, 0,05 bzw. 0,1 ml Kakaobohnenextrakt 1:10, Reaktionstemperatur 37°C, Reaktionsdauer 24 Std.)
Konzentrationen: oben 0,05 ml Extrakt
unten 0,1 ml Extrakt

Pektinesterase und Polygalakturonase

Der Nachweis von Polygalakturonase und Pektinesterase, unter Verwendung von Natriumpektat, bzw. Pektin als Substrat, gelingt mit der Lochtest-Methode nicht.

5) Pektinesterase

Die Pektinesterase war mit Hilfe der Methode von F. KIERMEIER(27) feststellbar. Die Aktivität steigt mit zunehmender Keimung an. Die Kakaobohnen aus Costarica haben eine um 27% wirksamere Pektinesterase als die aus Ghana (Tabelle V und Abb. 5).

Tabelle V
Vergleichende Aktivitätsbestimmung von Pektinesterase ungekeimter und angekeimter Bohnen aus Ghana und Costarica
Angabe in Pektinesterase-Einheiten
(1 PE-E = Fermentmenge, die in 1 Minute 1 mval Ester bei 3o°C hydrolysiert) (1 ml CO_2 = o,449 x $1o^{-4}$ mval)
Die Zahlen geben die in 1 Minute freigesetzten mval Ester, ausgedrückt in PE-E, an.

Herkunft der Kakaobohnen	ungekeimt PE-E	angekeimt (o,3 cm Keimlingslänge) PE-E	Aktivitätszunahme %	angekeimt (1,o cm Keimlingslänge) PE-E	Aktivitätszunahme %
Ghana	3,7 x $1o^{-7}$	4,2 x $1o^{-7}$	13,5	4,7 x $1o^{-7}$	27
Costarica	4,9 x $1o^{-7}$	6,4 x $1o^{-7}$	3o,6	7,o x $1o^{-7}$	42,8

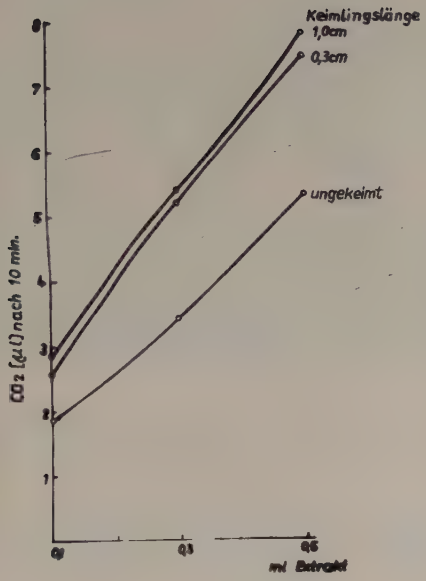


Abb. 5a

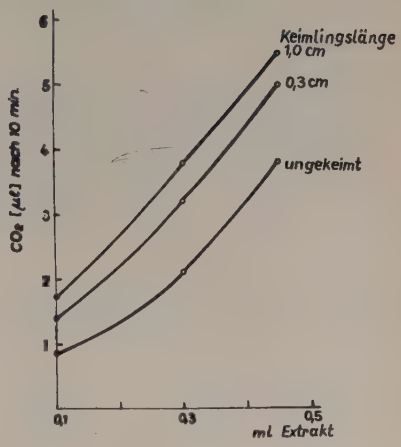


Abb. 5b

Abb. 5
Pektinesterase-Aktivität in ungekeimten und angekeimten Kakaobohnen bei verschiedenen Keimlingslängen
a) aus Costarica b) aus Ghana
(Versuchsansatz: o,5 ml 2%ige Pektinlösung, 1 ml o,2m $NaHCO_3$-Lösung, o,5 ml o,6m NaCl-Lösung im Hauptgefäss und o,1, o,3, o,5 ml Enzymextrakt 1:1o im Seitengefäss, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 1o Min.)

6) Polygalakturonase

Auf Grund sehr geringer Aktivität ist es erst nach 2o Tagen Reaktionszeit möglich, eine Aussage darüber zu machen, in welchem Ausmaß der Abbau erfolgt. Mit zunehmender Keimung ist auch hier eine Aktivitätssteigerung zu beobachten, während Unterschiede zwischen den Kakaobohnen aus Ghana und aus Costarica in der Wirksamkeit der Polygalakturonase nicht klar erkennbar sind (Tabelle VI).

Tabelle VI
Vergleich der Aktivität von Polygalakturonase ungekeimter und angekeimter Kakaobohnen aus Ghana und Costarica
(Versuchsansatz: 5o ml 3%ige Pektinlösung, o,5, 1 oder 4 ml Kakaobohnenextrakt 1:1, McIlvaine-Puffer (o,1 m Citronensäure, o,2 m Dinatriumphosphat) p_H 4,o, 2 Tropfen Toluol, Reaktionstemperatur 2o°C, Reaktionsdauer 2o Tage)
Die angegebenen Werte stellen die Abbauzahlen = A, d.h. die Abnahme der spezifischen Viskosität in Prozent der spezifischen Viskosität der unabgebauten Pektinlösung dar.

$A = \frac{ta - t}{ta - to} \times 100$; ta = Ausflußzeit der Pektinlösung (Blindwert)
t = Ausflusszeit der Pektinlösung nach 1 Min.
to = Wasserwert

Herkunft der Kakaobohnen	Extraktmenge 1:1 ml	Abbauzahl ungekeimt	Abbauzahl angekeimt Keimlingslänge 1 cm	Aktivitätszunahme %
Ghana	4	1,5	9,3	52o
	1	3,1	1o,1	226
	o,5	4,6	12	161
Costarica	4	1,5	7,9	426
	1	3,1	9,8	216
	o,5	4,4	11,2	154

Diese minimale Enzymwirkung ist bei pflanzlichen Produkten zu erwarten, da Polygalakturonase im Vergleich zur Pektinesterase selten und nur in kleinen Mengen auftritt (25).

Überraschend erscheint zunächst der Umstand, dass höhere Konzentrationen an Kakaoextrakt einen geringeren Abbau hervorrufen. Zu erklären ist dieses Verhalten mit den Ergebnissen der Arbeiten von A. POLLARD, M.E. KIESER und D.J. SISSONS (37). Diese Autoren stellten fest, daß die Zugabe von phenolischen Substanzen wie Leucoanthocyanin und d-Catechin zu Hefe-Polygalakturonase eine Hemmung des Enzyms bewirkt, die mit wachsender Konzentration an Phenolkörpern ansteigt. Die genannten Substanzen sind im Kakao von W.G.C. FORSYTH (12,13) nachgewiesen. Vorliegender Untersuchungsbefund kann als erneuter Beweis für ihre Anwesenheit gedeutet werden.

7) Katalase

Die Bestimmung erfolgt in der Warburg-Apparatur nach A.M. ALTSCHUL, M.L. KARON und L. KYAME (1).

Kakaobohnen aus Ghana und Costarica zeigen nur geringe Unterschiede in ihrer Katalase-Aktivität. Die Zunahme der Katalase-Aktivität während der Keimung ist in beiden Fällen nur minimal, während bei anderen Fermenten eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet wird (Abb. 6).

Abb. 6a

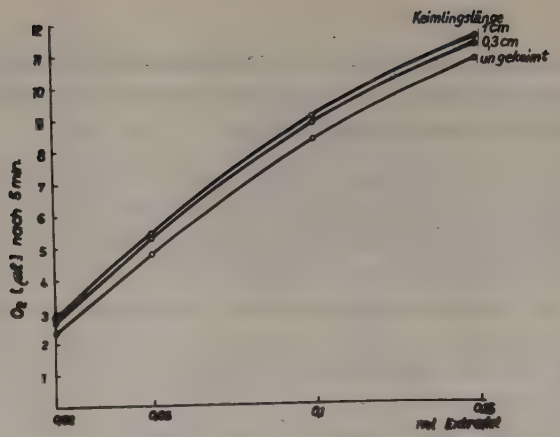


Abb. 6b

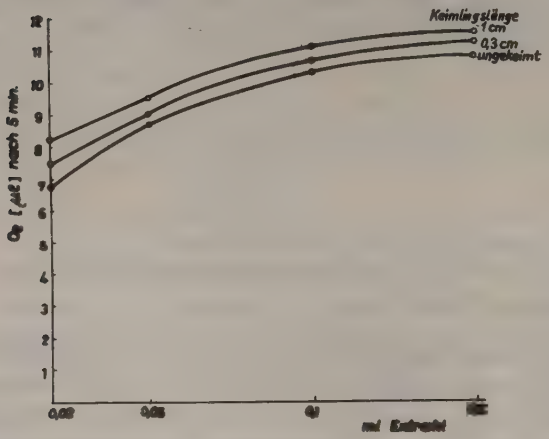


Abb. 6

Katalase-Aktivität in ungekeimten und angekeimten Kakaobohnen bei verschiedenen Keimlingslängen

a) aus Ghana, Aktivitätssteigerung 6,0% bzw. 8,4% bei 0,3 cm bzw. 1,0 cm Keimlingslänge(bezogen auf die ungekeimten Kakaobohnen)

b) aus Costarica, Aktivitätssteigerung 3,9% bzw.7,8% bei 0,3cm bzw. 1,0 cm Keimlingslänge(bezogen auf die ungekeimten Kakaobohnen)

(Versuchsansatz: 1,0 ml 0,07m Phosphatpuffer von p_H 6,8, 1 ml H_2O und 0,02, 0,05, 0,1, 0,15 ml Enzymextrakt 1:10 im Hauptgefäss und 0,15 ml 0,18n H_2O_2 im Seitengefäss, Reaktionstemperatur 20°C, Reaktionsdauer 5 Min.)

8) Peroxydase

Zur Ermittelung der Aktivität ist besonders die von A. PURR (39) entwickelte Methode zur Bestimmung pflanzlicher Peroxydasen als günstig erkannt worden. Als Maß für die Menge des Enzyms dient die mit dem Index Ascorbinsäure (Asc.) gekennzeichnete Peroxydase-Einheit (P.E.)Asc., nämlich das looofache derjenigen Enzymmenge, für welche unter den gegebenen Reaktionsbedingungen die Konstante der monomolekularen Reaktion o,ool ist. Die Reaktionskonstante kennzeichnet also zugleich die Anzahl Peroxydase-Einheiten in der Bestimmungsprobe. Der Peroxydasewert (P.W.)Asc. gibt die Anzahl der Peroxydase-Einheiten (P.E.)Asc. in 1g Präparat an.

Die Aktivität der Peroxydase in Kakaobohnen liegt, verglichen mit anderen Naturprodukten, hoch (Tabelle VIII). Der Peroxydase-Wert $(P.W.)_{Asc.}$ von Costarica-Bohnen übersteigt den von Ghana-Bohnen um 16,4%. Die Aktivitätszunahme während der Keimung ist bei Costarica-Bohnen ebenfalls höher (Tabelle VII und Abb. 7).

Tabelle VII
Vergleich der Aktivität von Peroxydase ungekeimter und angekeimter Kakaobohnen aus Costarica und Ghana

Herkunft der Kakaobohnen	ungekeimt $(P.W.)_{Asc.}$	angekeimt Keimlingslänge o,3 cm $(P.W.)_{Asc.}$	Aktivitätszunahme %	angekeimt Keimlingslänge 1,o cm $(P.W.)_{Asc.}$	Aktivitätszunahme %
Ghana	146	151	3,4	157	7,5
Costarica	17o	183	4,1	2o7	21,6

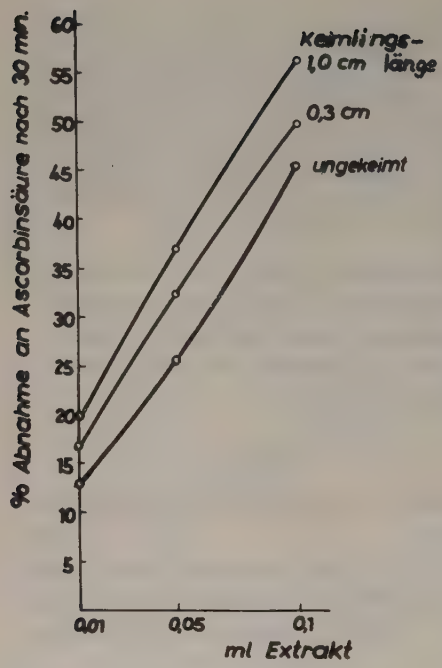


Abb. 7a

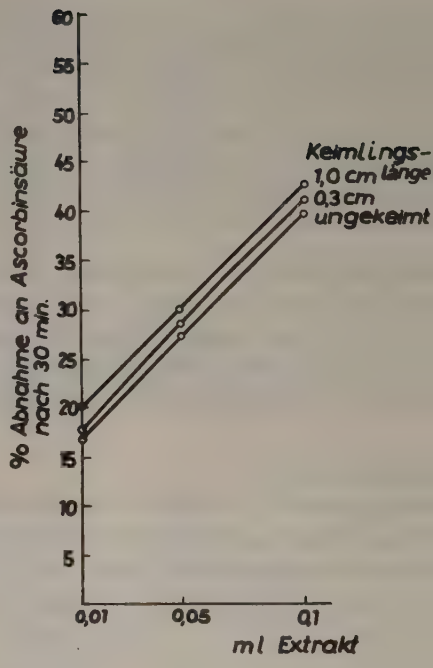


Abb. 7b

Abb. 7
Peroxydase-Aktivität in ungekeimten und angekeimten Kakaobohnen bei verschiedenen Keimlingslängen
a) aus Costarica b) aus Ghana
(Versuchsansatz: 4,o ml n/2o Ascorbinsäure, 1o,o ml Phosphat-Citronensäure-Oxalsäurepuffer, p_H 5,o, 5 ml n/1o H_2O_2-Lösung, 1 ml o,5%ige o-Tolidinlösung und o,o1, o,o5, o,1 ml Enzymextrakt 1:1, Reaktionstemperatur 25°C, Reaktionsdauer 3o Min.)

Tabelle VIII
Peroxydase-Aktivität in Kakaobohnen aus Ghana und Costarica im Vergleich zu verschiedenen pflanzlichen Produkten

Art	Menge $(P.W.)_{Asc.}$ = $(P.E.)_{Asc.}$ in 1g Substanz
Weißkohl	38o,o
Kohlrabi	4ooo,o
Karotten	15,o
Kartoffeln	6o,5
Rohhafer	25o,o
Vollsoja (Kern + Schale)	118
Kakao (Ghana)	146
Kakao (Costarica)	17o

9) Polyphenoloxydase

Die meisten Autoren beschreiben ein p_H-Optimum im Bereich von 7, während K.W. DEWITT (1o) es bei 5,o fand. Nach den Ergebnissen eigener Untersuchungen liegt das p_H-Optimum bei 6,4. Dieser Befund wird sowohl unter Verwendung von Brenzkatechin als auch von 1-Epicatechin, dem natürlichen Hauptsubstrat der Kakaopolyphenoloxydase (18), in Acetontrockenpulvern aus frischen, unfermentierten Bohnen aus Costarica (Abb. 8 und 9) erhoben.

Das zur Bestimmung verwendete Substrat ist zunächst Brenzkatechin. Die Messung der Polyphenoloxydase-Aktivität (Sauerstoffverbrauch) erfolgt in der Warburg-Apparatur. Als Enzymmaterialien werden das aus den Bohnen in der üblichen Weise hergestellte Acetontrockenpulver sowie Extrakte aus den frischen Kakaobohnen verwendet. Der Nachweis der Enzymwirkung wird durch ihr Ausbleiben im Erhitzungstest erbracht (Abb. 1o). Damit wird gleichzeitig die Abwesenheit von oxydierbaren Verunreinigungen im Enzympräparat bewiesen.

Beim Vergleich mit natürlichen Substraten, die Kakaoinhaltsstoffe sind, zeigt sich, daß die Sauerstoffaufnahme von Brenzkatechin bei Anwendung aequimolekularer Konzentration die des 1-Epicatechins um das 1,9fache, die des Cyanidinhydrochlorids um das 5fache übertrifft (Tabelle IX).

Tabelle IX
Sauerstoffaufnahme bei Verwendung von Brenzkatechin, 1-Epicatechin und Cyanidinhydrochlorid als Substrate, Bohnen aus Costarica

Enzymquelle	Acetontrockenpulver aus ungekeimten Kakaobohnen		Keimlingssuspension 1:1o	
Substrat	m/1o 1-Epicatechin	m/1o Brenzkatechin	m/1o Cyanidinhydrochlorid	m/1oBrenzkatechin
Sauerstoffaufnahme nach 18oMin.	27,5	72	9,5	47

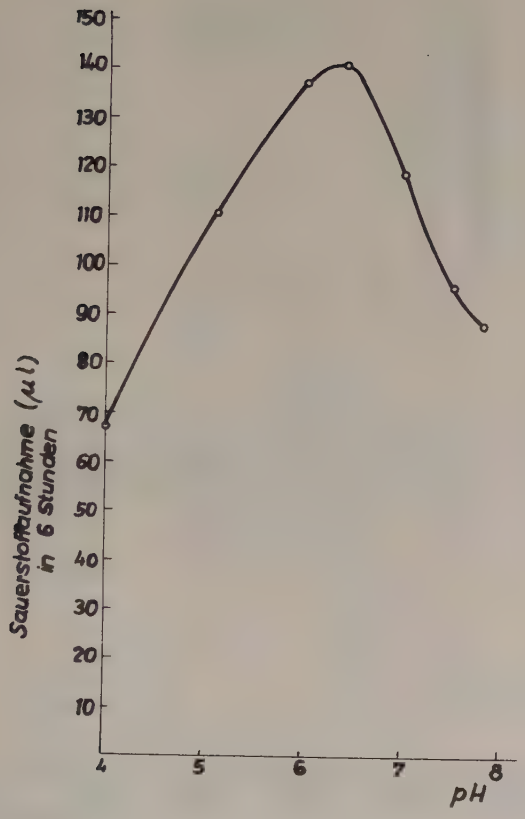


Abb. 8

p_H-Aktivitätskurve von Polyphenoloxydase unter Verwendung von Brenzkatechin als Substrat

(Versuchsansatz: 200 mg Acetontrockenpulver aus Costarica-Bohnen, 0,25 ml m/4 Brenzkatechin und 2,5 ml McIlvainepuffer, Reaktionstemperatur 30°C, Reaktionsdauer 6 Std.)

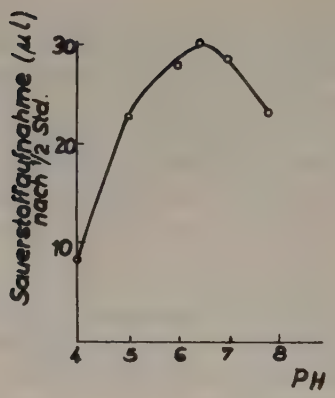


Abb. 9
p_H-Aktivitätskurve unter Verwendung von l-Epicatechin als Substrat (Versucnsansatz: 2oo mg Acetontrockenpulver aus Costarica-Bohnen, o,25 ml m/loo l-Epicatechin und 2,5 ml McIlvainepuffer, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 3o min.)

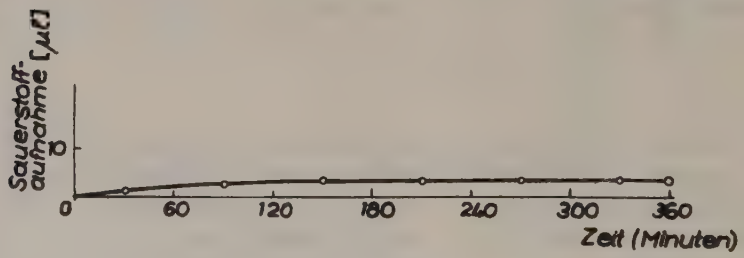
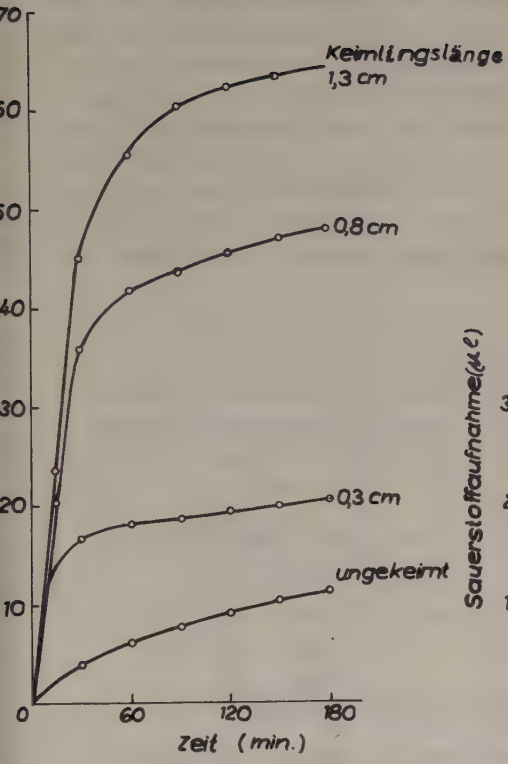


Abb. lo
Nachweis der Inaktivierung der Polyphenoloxydase nach Erhitzen zum Sieden (lo Min.) unter Stickstoff
(Versuchsansatz: 2oo mg Acetontrockenpulver aus Bahia-Bohnen, o,25 ml m/4 Brenzkatechin, 2,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 36o Min.)



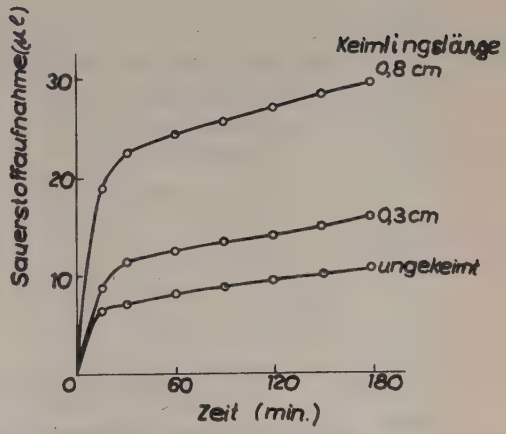


Abb. 11a Abb. 11b

Enzymatische Oxydation von Brenzkatechin
a) aus Costarica-Bohnen b) aus Bahia-Bohnen
ungekeimt und bei verschiedenen Keimlingslängen
(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1 ml Enzymextrakt 1:2, 2,5 ml Mc-Ilvainepuffer, p_H 6,4, im Seitengefäss 0,25 ml 0,1 m Brenzkatechin, Reaktionstemperatur 30°C, Reaktionsdauer 180 Min.)

Die durch Polyphenoloxydase katalysierte aerobe Oxydation von Brenzkatechin verläuft bekanntlich in 2 Reaktionsstufen. Die Oxydationsprodukte der rasch ablaufenden ersten Stufe, die nach J.M. NELSON und C.R. DAWSON (34) o-Chinone sind, kondensieren in der zweiten Phase mit geringerer Reaktionsgeschwindigkeit. Im Kurvenverlauf äussert sich der Geschwindigkeitsunterschied derart, daß auf einen steilen Anstieg nach 3o Minuten ein allmählicher Übergang in die Horizontale erfolgt. Die Polyphenoloxydase-Aktivität ist in ungekeimten Bohnen aus Ghana und Costarica unterschiedlich, ebenso die Grösse der Aktivitätszunahme während der Keimung (Tabelle X und Abb. 11).

Tabelle X
Zunahme der Aktivität der Polyphenoloxydase von Kakaobohnen aus Bahia und Costarica mit fortschreitender Keimung nach 18o Minuten

Keimlingslänge cm	Aktivitätszunahme %	
	Bahia	Costarica
o,3	48	87
o,8	18o	336
1,3	-	482

Setzt man nach einer Reaktionszeit von 6o Minuten, nachdem die erste Reaktionsstufe bereits ausläuft, erneut die gleiche Menge Substrat (l-Epicatechin) zu, so tritt eine wiederholte Sauerstoffaufnahme ein. Diese ist nur etwas geringer als die zu Beginn der Reaktion auftretende. Ein Zusatz von einer weiteren Enzymmenge nach 6o Minuten bewirkt keine neue Sauerstoffaufnahme (Abb. 12).

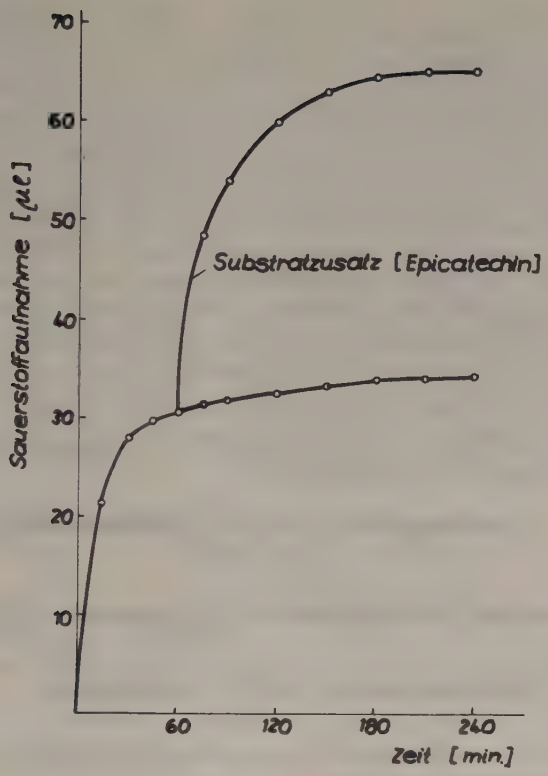
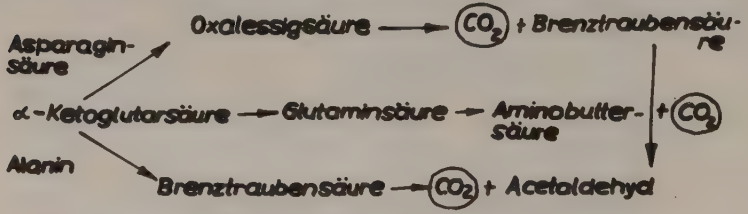


Abb. 12
Sauerstoffaufnahme unter Verwendung von o,1 m l-Epicatechin als Substrat. Nach 6o Minuten erneuter Zusatz von o,1 m l-Epicatechin zum Polyphenoloxydaseansatz
Extrakt aus Costarica-Bohnen, ungekeimt
(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 2oo mg Acetontrockenpulver, 2,5 ml, bzw. 2,25 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, im Seitengefäss o,25 ml, bzw. o,5 ml, o,1 m l-Epicatechin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 24o Min.)

lo) α-Decarboxylase

C. NEUBERG und Mitarbeiter (35,36) fanden in Hefe, W. ZALESKI und E. MARX (56,57) in höheren Pflanzen ein Enzym, das α-Ketosäuren decarboxyliert. O. SCHALES und S.S. SCHALES (42,43) berichten von einem Enzym aus höheren Pflanzen, welches eine einzige Aminosäure, nämlich Glutaminsäure, decarboxyliert, weshalb sie dieser Aminosäure eine besondere Stellung einräumten. Die genannten Autoren geben eine nähere Beschreibung des Enzyms und seiner Wirkungsweise in den verschiedenen pflanzlichen Organismen. Sie prüften eine beträchtliche Anzahl von Pflanzenextrakten und kamen zu dem Ergebnis, daß neben Glutaminsäure Brenztraubensäure und α-Ketoglutarsäure in verschiedenem Maße Kohlendioxyd abspalten. Dabei erwiesen sich L-Asparaginsäure und L-Alanin als einzige Aminosäuren als Aktivatoren.

Aus der Tatsache, daß Asparaginsäure oder Alanin für einen enzymatischen Angriff auf α-Ketoglutarsäure notwendig sind, folgert man, daß der erste Schritt des Abbaus in einer Transaminierung liegt, wobei die genannten Aminosäuren als NH_2-Donatoren fungieren. α-Ketoglutarsäure wird in Glutaminsäure übergeführt, die bei der Decarboxylierung ein Mol Kohlendioxyd liefert. Oxalessigsäure zerfällt in 1 Mol Kohlendioxyd und Brenztraubensäure. Diese, entweder ein Produkt der Oxalessigsäure-Decarboxylierung oder der Alanin-Transaminierung, wird von der α-Decarboxylase unter Bildung von ebenfalls 1 Mol Kohlendioxyd angegriffen.



Zur Bestimmung des freigesetzten CO_2 eignet sich am besten die manometrische Methode nach Warburg.

Der Nachweis von α-Decarboxylase ist durch die Entwicklung von CO_2 aus α-Ketoglutarsäure erbracht. Die Extrakte entwickeln aus α-Ketoglutarsäure mehr CO_2 als aus Brenztraubensäure und Glutaminsäure (Tabelle XI). Die gebildete CO_2 steht etwa in folgendem Verhältnis: Glutaminsäure:Brenztraubensäure: α-Ketoglutarsäure = 1:2:3. Dieser Befund steht demzufolge in Einklang mit den oben erwähnten Ausführungen, die eine besonders starke CO_2-Bildung aus α-Ketoglutarsäure erwarten lassen, gefolgt von Brenztraubensäure und Glutaminsäure. Im Verlauf der Keimung tritt eine Aktivitätszunahme ein, wobei die

Bohnen aus Costarica die aus Ghana in der Decarboxylierung übertreffen (Tabelle XI).

Tabelle XI

CO_2-Entwicklung durch α-Decarboxylase aus unfermentierten Kakaobohnen bei verschiedenen Keimstadien unter Verwendung von α-Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure und Glutaminsäure als Substrat, Vergleich der Aktivität ungekeimter und angekeimter Bohnen aus Ghana und Costarica.

(Versuchsansatz: 4 ml Enzymextrakt im Hauptgefäss und o,5 ml 1%ige Lösung von L-Glutaminsäure, α-Ketoglutarsäure oder Brenztraubensäure im Seitengefäss. Nach 6o Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von o,5 ml 1,2n Schwefelsäure über das Seitengefäss beendet.)

Herkunftsland der Kakaobohnen	Substrat	In 1 Std. gebildete Menge CO_2 aus 1 g Kakaobohnen (Nassgewicht) ml			Aktivitätszunahme %	
		ungekeimt	angekeimt			
			Keimlingslänge o,3cm	Keimlingslänge 1 cm	Keimlingslänge o,3cm	Keimlingslänge 1 cm
Costarica	Glutaminsäure	1,6	5,5	2,5	244	56,2
	Brenztraubensäure	2,9	7,3	3,3	152	13,8
	α-Ketoglutarsäure	4,7	8,2	5,3	74,5	12,8
Ghana	Glutaminsäure	1,o	1,8	2,4	8o	14o
	Brenztraubensäure	1,9	2,7	2,9	42,2	52,7
	α-Ketoglutarsäure	3,6	5,9	6,4	64	77,8

Bei der Provenienz Costarica war bei einer Keimlingslänge von 1 cm der Keimling am Absterben, was durch das Auftreten roter und brauner Stellen an der Spitze zu ersehen war und sich auch durch die beobachtete Aktivitätszunahme bemerkbar machte (Tabelle XI).

Auch bei den Kakaobohnen tritt eine Aktivierung durch L-Asparaginsäure und DL-Alanin ein (Tabelle XII). L-Asparaginsäure ist wirksamer als DL-Alanin. Die Hälfte der Wirksamkeit ist an sich zu erwarten, weil nur die L-Form das Reaktionsgeschehen aktiviert.

Tabelle XII
CO_2-Entwicklung aus α-Ketoglutarsäure durch α-Decarboxylase bei Zusatz von L-Asparaginsäure und DL-Alanin
(Versuchsansatz: 4 ml Enzymextrakt im Hauptgefäss, o,5 ml 1%ige Lösung von α-Ketoglutarsäure und o,5 ml m, m/5, m/1o DL-Alanin oder m/1o, m/1oo L-Asparaginsäure im Seitengefäss. Nach 6o Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von o,5 ml 1,2n Schwefelsäure über das Seitengefäss beendet.)

Substrat: α-Ketoglutarsäure	CO_2-Entwicklung aus 1g Kakaobohnen (Naßgewicht) (Costarica) in 1 Std.	Aktivitätszunahme %
ohne Aminosäurezusatz	3,6	-
m/1o DL-Alanin	4,7	3o,5
m/5 DL-Alanin	5,8	61,2
m DL-Alanin	8,6	138,8
m/1oo L-Asparaginsäure	4,5	25
m/1o L-Asparaginsäure	6,9	91,5

Die CO_2-Entwicklung verhält sich bei Anwendung gleicher Konzentrationen wie folgt: L-Asparaginsäure:DL-Alanin = 3:2

Nach O. SCHALES und S.S. SCHALES (43) erhält man einen Aktivitätsindex durch diejenige Menge CO_2, die in einer Stunde durch Wirkung eines Enzymextraktes von 1 g Pflanzenmaterial (Naßgewicht) freigesetzt wird. Die Enzymaktivitäten der α-Decarboxylase in den frischen, ungekeimten Kakaobohnen entsprechen etwa denen, die Rosenkohl, Süßkartoffeln, Runkelrüben, Rotkohl, Kopfsalat, Spinat, Artischoken und Gurken aufweisen (Tabelle XIII).

Tabelle XIII
CO_2-Bildung durch α-Decarboxylase bei Kakaobohnen aus Ghana und Costarica im Vergleich zu verschiedenen pflanzlichen Produkten

Enzymquelle	aus 1 g Naßgewicht in 1 Std. freigesetzte Menge CO_2 ml
Melone	158
Korn	148
Kürbis	4o
Blumenkohl, Petersilie, Senf, Pfeffer	1o-2o
Rettich, Kartoffeln, Wirsing, Kohl	1o-2o
Rosenkohl, Süßkartoffeln, Runkelrüben	2-9
Rotkohl, Kopfsalat, Spinat, Artischoken, Gurke	2-9
Kakaobohnen (Ghana	3,6
Kakaobohnen (Costarica)	4,7
Endiviensalat, Bohnen, Sellerie	< 1
Zwiebeln, Bananen, Tomaten	< 1
Apfel, Orangen, Birnen, Grapefruit	o

11) Coenzym A

Im letzten Jahrzehnt gewann das Coenzym A wegen seiner Teilnahme an vielen biochemischen Prozessen zunehmend an wissenschaftlicher Bedeutung. Mit Ausnahme der Mitteilungen von E. SEIFTER (44) ist jedoch nur wenig über die Verteilung von Coenzym A in höheren Pflanzen bekannt. Ein Vorkommen von Coenzym A im Kakao ist bisher noch nicht beschrieben worden. Mit Hilfe der Methode von N.O. KAPLAN und F. LIPMANN (26) nach der Vorschrift von E. SEIFTER (44) ist das Coenzym A in Kakaobohnen nachweisbar.

Ghana-Bohnen haben einen höheren Gehalt an Coenzym A als Costarica-Bohnen. Verglichen mit anderen Pflanzenprodukten entspricht er dem der Karotten und Kartoffeln (Tabelle XIV).

Tabelle XIV
Coenzym A - Gehalt in Kakaobohnen aus Ghana und Costarica im Vergleich zu verschiedenen Pflanzen nach E. SEIFTER (44)
(Einheiten CoA je Gramm Trockengewicht)

Apfel (Frucht)	3	Mais (Körner)	42,6
Buchweizen (Samen)	3o	Orange (Samen)	14,2
Canadabalsam (Körner)	38	Orange (Schale)	2,1
Erdnuss (Samen)	47	Orange (Fruchtfleisch)	36
Fichte (Samen)	34	Salat (Blatt)	14,2
Hevea (Samen)	41	Senf (Samen)	39,7
Karotten (Xylem)	16,7	Spinat (Blatt)	8,1
Karotten (Phloem)	21,6	Valeriana Sp. (Wurzel)	24
Kartoffel (Knollen)	5,3	Valeriana Sp. (Blatt)	13,2
Kartoffel (Knospe)	17,6		
Eigene Versuche:			
Kakao (Ghana)	2o,4		
Kakao (Costarica)	18,2		

Die Abbildung 13 zeigt die Abhängigkeit des Sulfanilamidverbrauchs von der Menge an Kakaobohnenextrakt. Die Bestimmung des Coenzym A verläuft in Extrakten von Acetontrockenpulvern aus frischen Kakaobohnen ergebnislos. Es besteht Veranlassung zu der Annahme, daß sich eine störende Wirkung der Tannine in beiden Fällen bemerkbar macht. A.R. GUSSEWA und M.G. BORICHINA (19) konnten in den Blättern von Bohnen, Rüben und Tabak kein Coenzym A nachweisen. Sie stellten fest, daß wässrige Extrakte dieser Pflanzen die Acetylierung von Sulfanilamid hemmen. Als Inhibitoren wurden Chlorogensäure, Phloroglucin, Hydrochinon und Kaffeesäure ermittelt.

Es ist von Interesse festzustellen, ob die Kakaoinhaltsstoffe eine ähnliche Wirkung zeigen. Als Hemmkörper kommen Epicatechin und Cyanidin in Frage. Mit Epicatechin konnte keine eindeutige Hemmung der Acetylierung beobachtet werden, da die Substanz im p_H-Bereich von 8,0 - 8,4, in dem die Bestimmung durchgeführt wird, unbeständig ist. Anders jedoch verhält sich das Cyanidin, dessen Inhibitorwirkung klar zum Ausdruck kommt (Tabelle XV).

Tabelle XV
Hemmung der Acetylierung von Sulfanilamid unter den Bedingungen der Coenzym A - Bestimmung nach N.O. KAPLAN und F. LIPMANN (26) durch Cyanidinhydrochlorid

angewandte Menge Cyanidinhydrochlorid	verwendete Menge CoA	Hemmung %
1,42 mg	9,9 Einheiten	50,1
1,44 mg	9 Einheiten	50,3

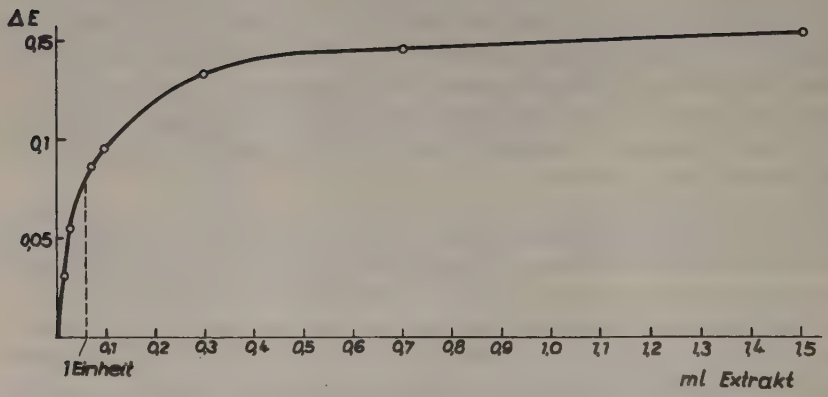


Abb. 13
Coenzym A in wässrigem Extrakt aus Kakaobohnen (Costarica) durch Messung des Extinktionsrückganges nach erfolgter Acetylierung von Sulfanilamid; Extinktionsmessung bei 540 mμ
(Versuchsansatz: 1,0 ml Zentrifugat (aus: 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,3; 0,7; 1,5 ml Kakaobohnenextrakt 1:1, 1,5 ml Wasser, 0,15 ml Tris-Puffer, 0,5 ml 0,2m Cysteinhydrochlorid, 0,5 ml Standard-Sulfanilamid-Lösung, 0,3 ml Taubenleberenzymlösung, Reaktionstemperatur 37°C, Reaktionsdauer 1,5 Std.; danach Zugabe von 4,0 ml 5%iger Trichloressigsäure), 1o,0 ml 0,2n Salzsäure, 1,0 ml 0,1%ige Natriumnitritlösung und 1,0 ml 0,5%ige Amidosulfonsäureamidlösung, Reaktionstemperatur 0°C, Reaktionsdauer 5 Min.)

III GEKOPPELTE REAKTIONEN ZWISCHEN DEN PRIMÄREN OXYDATIONSPRODUKTEN DER POLYPHENOLOXYDASE UND EIWEISSABBAUPRODUKTEN

Fügt man nach 3o Minuten, dem Beginn des Ablaufs der zweiten Reaktionsstufe (siehe Abb. 11), einzelne Aminosäuren und Peptide zu, so wird die Sauerstoffaufnahme im allgemeinen, wenn auch schwach, gefördert (Abb. 14 und Tabelle XVI).

Tabelle XVI
Zunahme der Aktivität der Polyphenoloxydase in 18o Minuten nach Zusatz von Glycin und Glycyl-DL-Leucin, Versuchsansatz: Abb. 14, Bohnen aus Bahia, Keimlingslänge o,8 cm

zugesetzte Aminosäure bzw. Peptid	Aktivitätszunahme %
Glycin	o,5
Glycyl-DL-Leucin	1,8

In diesem Zusammenhang hat ein Prolinzusatz besonderes Interesse. L-Prolin zeigt, allein zugesetzt, keine nennenswerte Wirkung, während es mit anderen Aminosäuren, Peptiden und niederen Proteinen kombiniert außerordentlich stark die Sauerstoffaufnahme fördert. Sowohl bei Verwendung von Suspensionen aus Keimlingen als auch von Extrakten aus angekeimten Bohnen wird dieser Effekt beobachtet. Quantitative Unterschiede im Sauerstoffverbrauch sind einmal bei Bohnen aus Ghana oder Bahia bzw. Costarica feststellbar, zum anderen bei allen genannten Bohnen in verschiedenen Keimstadien vom Stadium der Keimung abhängig (Tabelle XVII und Abb. 15,16).

Ganz allgemein kann festgestellt werden, dass Glycin von allen untersuchten Aminosäuren mit Abstand die höchste zusätzliche Sauerstoffaufnahme auslöst; dann folgen mit abfallender Wirkung DL-Threonin, DL-Serin, L-Alanin und L-Lysin (Abb. 17). B. BIEHL (5) stellte fest, daß diese Aminosäuren in den Kakaobohnen reichlich vorkommen. Keinen Einfluss üben, obwohl ebenfalls im Kakaoprotein vorhanden, D-Arginin, L-Glutaminsäure und L-Leucin aus.

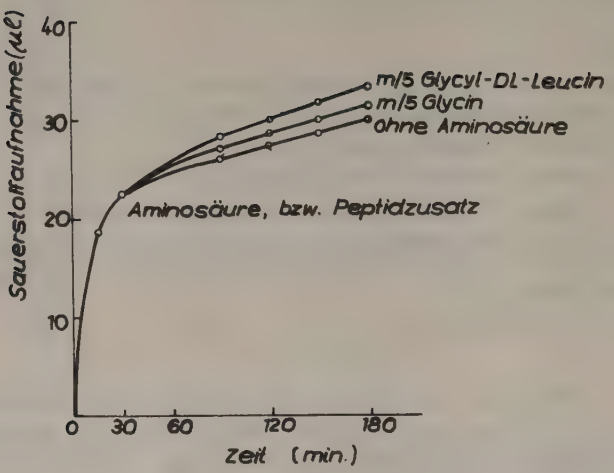


Abb. 14

Sauerstoffaufnahme bei Zusatz von o,2m Glycin und o,2m Glycyl-DL-Leucin zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten, Extrakt aus Bahia - Bohnen, Keimlingslänge o,8 cm

(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Enzymextrakt 1:2, 2,o ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin, bzw. m/5 Glycyl-DL-Leucin oder m/5 Glycin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 18o Min.)

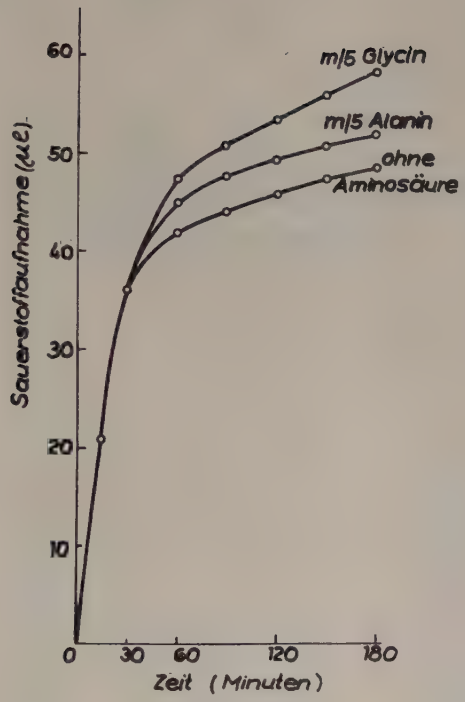


Abb. 15a
Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Aminosäuren bzw. Peptiden zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten, Extrakt aus Costarica-Bohnen, Keimlingslänge o,8 cm
(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Enzymextrakt 1:2, 1,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, o,5 ml m/5o L-Prolin, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin, bzw. m/5 Glycin oder m/5 DL-Alanin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 18o Min.)

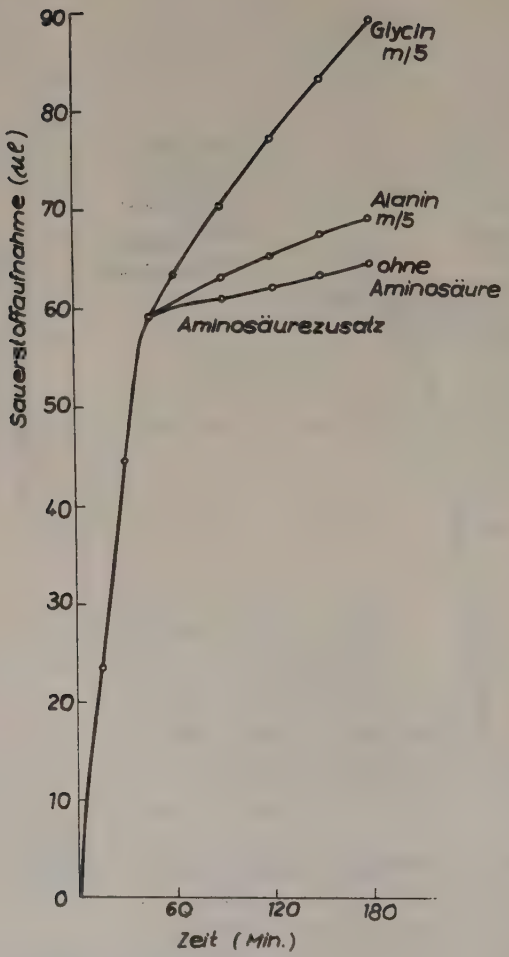


Abb. 15b

Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Aminosäuren zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten, Extrakt aus Costarica-Bohnen, 1,3 cm Keimlingslänge (Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Enzymextrakt 1:2, 1,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, o,5 ml m/5o L-Prolin, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin, bzw. m/5 Glycin oder m/5 DL-Alanin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 18o Min.)

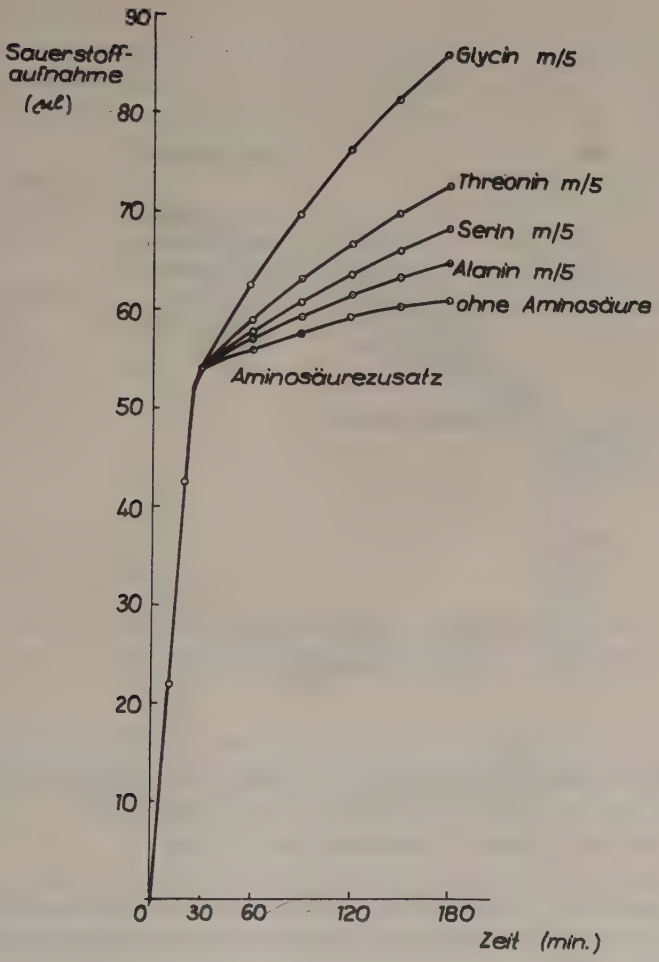


Abb. 16
Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Aminosäuren zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten,
Suspension von Keimlingen aus Amelonado-Bohnen (Ghana)
(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Keimlingssuspension 1:1o, 1,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, o,5 ml m/5o L-Prolin, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin, bzw. m/5 Glycin, DL-Threonin, DL-Serin oder DL-Alanin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 18o Min.)

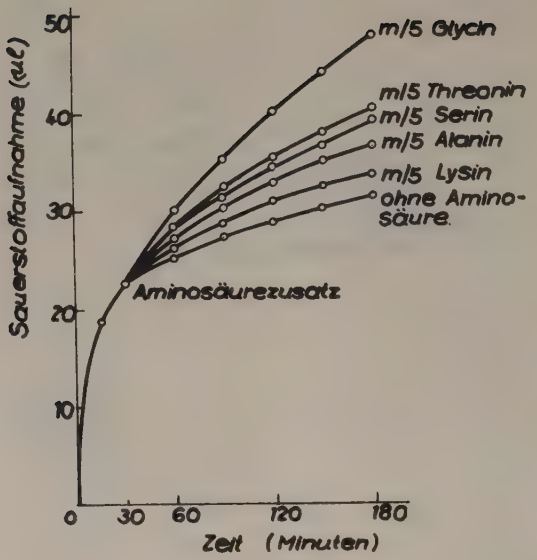


Abb. 17
Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Aminosäuren zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten,
Extrakt aus Bahia-Bohnen, Keimlingslänge o,8 cm
(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Enzymextrakt 1:2, 1,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, o,5 ml m/5o L-Prolin, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin bzw. m/5 Glycin, DL-Threonin, DL-Serin, DL-Alanin oder L-Lysin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 1ö0 Min.)

Tabelle XVII
Zunahme der Aktivität der Polyphenoloxydase in Kakaobohnen aus Bahia, Costarica und Ghana in 18o Minuten nach Zusatz von Aminosäuren in Anwesenheit von L-Prolin, Versuchsansatz: Abb. 14 - 18

Zugesetzte Aminosäuren bzw. Peptide	Aktivitätszunahme %			
	Bahia Keimlingslängeo,8cm	Costarica Keimlingslängeo,8cm	Costarica Keimlingslängel,3cm	Ghana Keimlinge
L-Alanin	8	7	7	7
L-Lysin	16	-	-	-
DL-Serin	24	-	-	12
DL-Threonin	29	-	-	2o
Glycin	53	2o	38	41
5% Zein	8	-	-	-
Diglycyl-Glycin	92	-	-	-
Glycyl-DL-Leucin	1o6	-	-	-

Die Dipeptide Glycyl-DL-Leucin und Glycyl- Glycin bewirken eine höhere Sauerstoffaufnahme als die Aminosäuren, das Tripeptid Diglycyl-Glycin und das Protein Zein (Abb. 18).

Das Ausmaß der durch Aminosäuren ausgelösten Sauerstoffaufnahme steigt mit deren Konzentration an (Tabelle XVIII und Abb. 19), wie hier am Beispiel Glycin gezeigt wird.

Tabelle XVIII
Zunahme der Aktivität der Polyphenoloxydase in Anwesenheit von L-Prolin in 18o Minuten nach Zusatz verschiedener Konzentrationen von Glycin, Versuchsansatz: Abb. 18, Bohnen aus Bahia, Keimlingslänge o,8 cm

Zugesetzte Aminosäure	Aktivitätszunahme %
m/1o Glycin	1o
m/5 Glycin	5o
m/2,5 Glycin	1o5

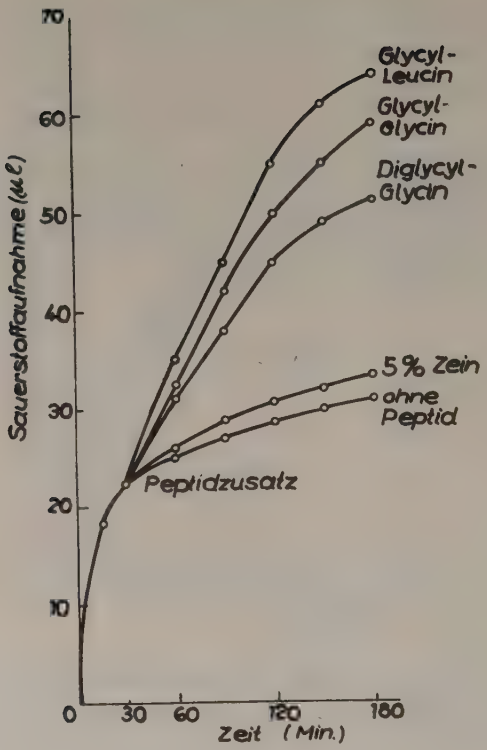


Abb. 18
Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Peptiden zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten,
Extrakt aus gekeimten Bahia-Bohnen, Keimlingslänge o,8 cm
(Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Enzymextrakt 1:2, 1,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, o,5 ml m/5o L-Prolin, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin, bzw. m/5 Glycyl-DL-Leucin, Glycyl-Glycin, Diglycyl-Glycin oder 5% Zein, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 18o Min.)

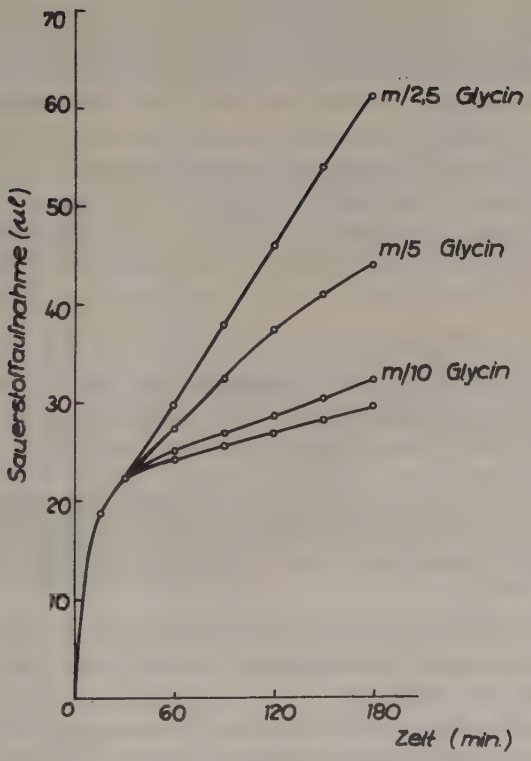


Abb. 19

Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Glycin in verschiedenen Konzentrationen zum Polyphenoloxydaseansatz nach 3o Minuten, Extrakt aus Bahia-Bohnen, o,8 cm Keimlingslänge (Versuchsansatz: Im Hauptgefäss 1,o ml Enzymextrakt 1:2, 1,5 ml McIlvainepuffer, p_H 6,4, o,5 ml m/5o L-Prolin, im Seitengefäss o,25 ml o,1m Brenzkatechin, bzw. m/2,5, m/5, m/1o Glycin, Reaktionstemperatur 3o°C, Reaktionsdauer 18o Min.)

B DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Die enzymatischen Prozesse waren bislang im Gegensatz zu den chemischen Umsetzungen verhältnismäßig selten Gegenstand von Untersuchungen.

Der Nachweis von Proteinase, Lipase, Amylase, Phosphatase, Pektinesterase, Polygalakturonase, Katalase, Peroxydase, Polyphenoloxydase und α-Decarboxylase ist als erstes Resultat der vorliegenden Untersuchungen in überzeugender Weise geglückt.

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß eine große Zahl von Veränderungen, die in Kakaobohnen während der Keimung vor sich gehen, das Ergebnis von Enzymwirkungen ist.

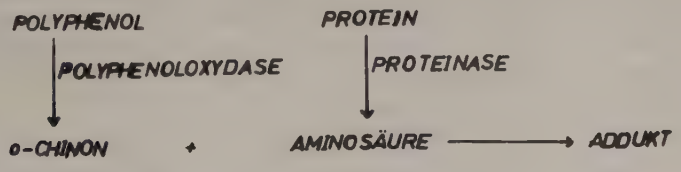
Nach R.W. WADSWORTH und G.R. HOWAT (51,52) ist die Keimung von Kakaobohnen als ein Teil der Fermentierung und der damit verbundenen Aromaentwicklung anzusehen. Die genannten Autoren kommen zu dieser Auffassung nicht auf Grund analytischer Befunde, sondern sinnenphysiologischer Prüfungen.

Als Ursache für das erstmalige Auffinden einiger der genannten Enzyme wird angenommen, daß die Verwendung von Extrakten aus frischen Kakaobohnen ausschlaggebend ist, in denen die gerbende Wirkung von Leukoanthocyanidinen noch gering ist. Man weiß, daß gerade diese Verbindungen, die auch in den Kakaobohnen durch Wirkung der Glykosidase aus Anthocyaninen (12 - 15) entstehen, Fermentinhibitoren sind (14,15,37). Die Tatsache, daß in einem so außerordentlich fettreichen (53,3% i.T.) und verhältnismäßig eiweißreichen (1o,5% i.T.) Samen weder Lipase gefunden noch Proteinase exakt nachgewiesen werden konnte, gab bereits früher Anlass zu zahlreichen Untersuchungen.

W.G.C. FORSYTH, V.C. QUESNEL und J.B. ROBERTS (16) wollen die Aktivität von Proteinase in Acetontrockenpulvern und Extrakten aus frischen Kakaobohnen nach der Milchgerinnungsmethode von A.K. BALLS und S.R. HOOVER (3) nachgewiesen haben. Sie berücksichtigten jedoch nicht die Anwesenheit gerbender Polyphenole, welche das Vorhandensein einer Aktivität durch Eiweißkoagulation vortäuschen können. Das Mißlingen des Nachweises von Proteinase durch M. HOLDEN (23) ist ebenfalls so zu deuten. Nicht alle Enzyme der Kakaobohnen sind derart empfindlich gegenüber der Gerbstoffwirkung, wie die im Versuchsteil beschriebenen Studien der Polyphenoloxydase unter Verwendung von Acetontrockenpulvern lehren.

H.C. BRILL (8) und C. CIFERRI (9) versuchten bereits, sich einen Überblick über die wichtigsten Enzyme in den Kakaobohnen zu verschaffen. Die genannten Autoren wiesen qualitativ Polyphenoloxydase, Peroxydase, Katalase, Invertase, Maltase, Amylase, Emulsin und Phosphatasen nach, jedoch z.B. keine Proteinase und Lipase. Auch die Versuche von H.F. BIRCH und E.C. HUMPHRIES (6), in frischen, getrockneten und fermentierten Kakaobohnen Lipase nachzuweisen, waren erfolglos. K.W. DEWITT (1o) erhielt aktive Präparate von Asparaginase mit Hilfe nichtwässriger Lösungsmittel. Auf eine proteolytische Wirkung deuten die von B. BIEHL (4,5) während der Fermentierung beobachteten Zunahme an α-Aminostickstoff und das erhöhte Auftreten freier Aminosäuren hin.

Neben den normalen Abläufen enzymatischer Prozesse ist ein interessantes Ineinandergreifen von Enzymwirkungen zu erkennen. G e k o p p e l t e R e a k t i o n e n treten zwischen den bei der enzymatischen Brenzkatechinoxydation durch Kakao-Polyphenoloxydase entstehenden primären Oxydationsprodukten und Proteinen, Peptiden, sowie den im Kakaoprotein vorhandenen Aminosäuren ein.



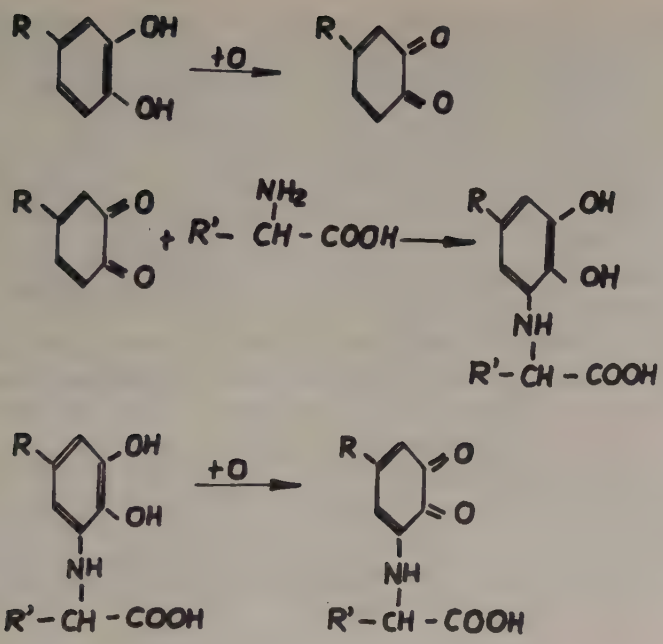
Von den untersuchten Aminosäuren erweist sich das Glycin im Sinne einer Vermehrung der Sauerstoffaufnahme am wirksamsten. Im Zusammenhang mit den Peptiden gewinnt dieser Befund erneut an Bedeutung:

Offensichtlich spielt bei den Peptiden die Aminosäure-Sequenz eine Rolle. Während sich Glycyl-DL-Leucin als eine im vorliegenden Sinne sehr aktive Substanz erweist, ist DL-Leucyl-Glycin ohne Einfluß. Glycyl-DL-Leucin scheint deshalb so wirksam zu sein, weil hier das Glycin, die Aminosäure, welche die Sauerstoffaufnahme am stärksten begünstigt, die NH_2-Gruppe zur Anlagerung bereitstellt.

Verbindungen mit Substituenten, die Elektronendonatoren darstellen, wie Hydroxy- oder Aminogruppen stabilisieren durch Herabsetzung des Redoxpotentiales Chinone (37). In diesem Sinne scheint das L-Prolin, dessen starke Förderung der Sauerstoffaufnahme in Kombination mit anderen Aminosäuren beschrieben wurde, besonders wirksam zu sein.

Die Beständigkeit der verschiedenen o-Chinone ist nicht gleich. A.L. KURSANOW (3o) stellte fest, daß das o-Chinon des l-Epicatechins sich durch eine bedeutend geringere Resistenz auszeichnet als das aus Brenzkatechin entstehende primäre Oxydationsprodukt. So wird der Untersuchungsbefund verständlich, daß die beschriebenen Reaktionen zwischen den primären Oxydationsprodukten des Brenzkatechins und Proteinabbauprodukten bei Ersatz von Brenzkatechin durch l-Epicatechin nicht beobachtet werden können.

Als Reaktionsablauf, der durch eine vermehrte Sauerstoffaufnahme charakterisiert ist, scheint der im folgenden dargestellte, den H. JACKSON und L.P. KENDAL (24) im Zusammenhang mit ihren Untersuchungen an Kartoffel- oder Champignon-Polyphenoloxydase erörtern, wahrscheinlich:



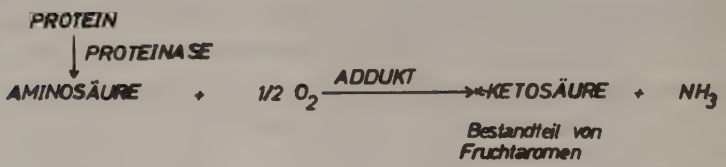
Eine Beteiligung der Polyphenoloxydase am Aminosäuremetabolismus wird auch beim Tabak und bei der Tollkirsche beschrieben (21,47).

Nicht zu unterscheiden in der Auswirkung von den eben beschriebenen Reaktionen ist der erneute Zusatz von l-Epicatechin zum Kakaobohnenextrakt bei Beginn der zweiten Reaktionsstufe (Abb. 12). Die von neuem auftretende starke Sauerstoffaufnahme beruht auf einem anderen Mechanismus: Die nach Ablauf der ersten Reaktionsstufe eingetretene Verarmung an Substrat wird aufgehoben.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Reaktionen schaffen auch Voraussetzungen für eine Umsetzung mit einem weiteren Molekül Aminosäure. Aminosäuren reagieren mit Chinonen sowohl durch nucleophile Substitution als auch durch Chinoniminbildung. Versuche von E.M. TRAUTNER und E.A.H. ROBERTS (49) deuten darauf hin, daß

nach Reduktion des Chinons durch Anlagerung eines Moleküls Aminosäure an den Phenolring (nucleophile Substitution) eine nochmalige Oxydation dieses Adduktes durch Polyphenoloxydase möglich ist. Das so entstandene o-Chinon kann ein zweites Molekül Aminosäure an einer seiner C=O-Gruppen anlagern, wobei ein Chinonimin entsteht. Dieses verwandelt sich auf dem Wege einer Umgruppierung, die einer Umaminierung ähnelt - die Ketogruppe des aromatischen Ringes entspricht der einer Ketosäure - , in Phenolimin. Nach Abspaltung der α-Ketosäure entsteht Phenolamin, welches unter Freisetzung von Ammoniak das ursprüngliche o-Chinon bildet (Schematische Darstellung S. 48, oberer Teil). Glycin, die hier als besonders wirksam erkannte Aminosäure, wird zu Glyoxylsäure, Alanin zu Brenztraubensäure desaminiert (49).

Das aus o-Chinon und Aminosäuren entstandene Addukt katalysiert ohne Mitwirkung der Polyphenoloxydase die oxydative Desaminierung der Aminosäuren, so daß eine "indirekte Oxydation der Aminosäuren" eintritt(21). Nach H.E. STREET (46) konnte bisher keine spezifische Aminosäureoxydase, wie sie in tierischen Organismen vorkommt, in pflanzlichem Material gefunden werden.



Auf diese Weise können sich in den Kakaobohnen Aromastoffe bilden, wie beispielsweise aus Threonin β-Hydroxy-α-Ketobuttersäure, die z.B. auch ein Bestandteil des Preiselbeer-Aromas (50) ist, sowie α-Ketobuttersäure, die das Aroma der Fleischbrühe bedingt (55).

Die Aktivität der Proteinase gewinnt im folgenden Zusammenhang erneut an Bedeutung: Aminosäuren für sich allein entwickeln Aromasubstanzen, wenn sie kurzfristig bei 15o - 18o°C (Röstprozess) der Maillard-Reaktion unterworfen werden. Die dabei entstehenden Melanoidine aus Glycin und Alanin sind die Träger eines biermalzähnlichen Aromas, während Phenylalanin einen Geruch nach welkenden Rosen bildet. Valin entwickelt ein feines Röstaroma. Verantwortlich für diese Aromabildung sind die aus den Aminosäuren durch Oxydation entstehenden höheren Aldehyde und Ketosäuren (2o).

Im Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen spielen die bereits erwähnten Glycyl-Peptide offensichtlich eine wichtige Rolle. Dieser Befund ist interessant im Hinblick darauf, daß reduzierende Zucker, z.B. Arabinose, Xylose (Pentosen), bzw. Glukose, Galaktose (Hexosen), die ebenfalls in den Kakaobohnen durch Glykosidasen gebildet werden, mit verschiedenen Peptiden bei Temperaturen zwischen 1oo - 15o°C in Reaktion treten, wobei die entstehenden Produkte schokoladeähnliche Aromen liefern. Besonders Glycyl-Peptide (z.B. Glycyl-Glycin) und Alanyl-Peptide (z.B. Alanyl-Glycin) sind zu dieser Aromabildung befähigt, während Proteine und Aminosäuren kein derartiges Aroma liefern (41).

Über eine Verminderung der Adstringens durch entstehende unlösliche Polyphenol-Protein-Komplexe berichten W.G.C. FORSYTH, V.C. QUESNEL und J.B. ROBERTS (16). Der beim Rösten von unveränderten Proteinen auftretende widerwärtige Geschmack tritt nicht in Erscheinung. W.R. POPOW (38) berichtet sogar, daß bei der Teefermentation diese Komplexe stark gefärbte Produkte sind, die einen angenehmen Blumen- und Obstduft entwickeln. G.F. SCHUBIGER, E. ROESCH und R.M. EGLI (45) bestätigen die Bildung von Peptido-Polyphenol-Komplexen in fermentierten Kakaobohnen durch den Nachweis von Substanzen, die sowohl Gerbstoffeigenschaften als auch Proteinreaktionen zeigen. Über den möglichen Weg ihrer Entstehung werden keine Angaben gemacht.

Studien an der hier erstmalig in der Kakaobohne festgestellten α-Decarboxylase lassen den Schluss zu, daß in den verwendeten Extrakten ein von O. SCHALES und S.S. SCHALES (43) in den anderen Pflanzenextrakten beobachteter Reaktionscyclus abläuft. Dieser Prozess führt zur Bildung von Oxalessigsäure und Glutaminsäure aus α-Ketoglutar-

säure und Asparaginsäure, sowie zur Bildung von Brenztraubensäure und Glutaminsäure aus α-Ketoglutarsäure und Alanin. Alanin und Asparaginsäure konnten in fermentierten Kakaobohnen von B. BIEHL (4,5) als Produkte der Proteolyse nachgewiesen werden. Die ausserdem aufgefundene β-Aminobuttersäure spricht ebenfalls für den Ablauf dieses Mechanismus während der Fermentierung (Schematische Darstellung S.48).

Dieser Reaktionscyclus der gekoppelten Transaminierungen und Decarboxylierungen steht mit den Reaktionsfolgen der oxydativen Desaminierungen, sowie mit denen des Fettsäure-, Citronensäure-und Glyoxylsäurecyclus durch die entstehenden α-Ketosäuren (Oxalessigsäure und Brenztraubensäure) in Beziehung. Das in dieser Arbeit in Kakaobohnen ermittelte Coenzym A als wesentlicher Katalysator in den aufgeführten Cyclen rundet das Bild im Sinne dieser Darlegungen ab.

Von den genannten Kreisprozessen gewinnt der Glyoxylsäurecyclus an Bedeutung. Die für seinen natürlichen Ablauf notwendigen Enzyme Isocitritase und Malatsynthetase sind in Mikroorganismen und Pflanzen (fettreichen Samen) nachgewiesen worden (28,29). Es zeichnen sich zwei Möglichkeiten einer Glyoxylsäurebildung in Kakaobohnen ab, einmal im Glyoxylsäurecyclus, zum anderen über die bereits beschriebene Phenoliminspaltung, so daß die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen den Glycin-Gerbstoff-Reaktionen und dem Glyoxylsäurecyclus erkennbar ist.

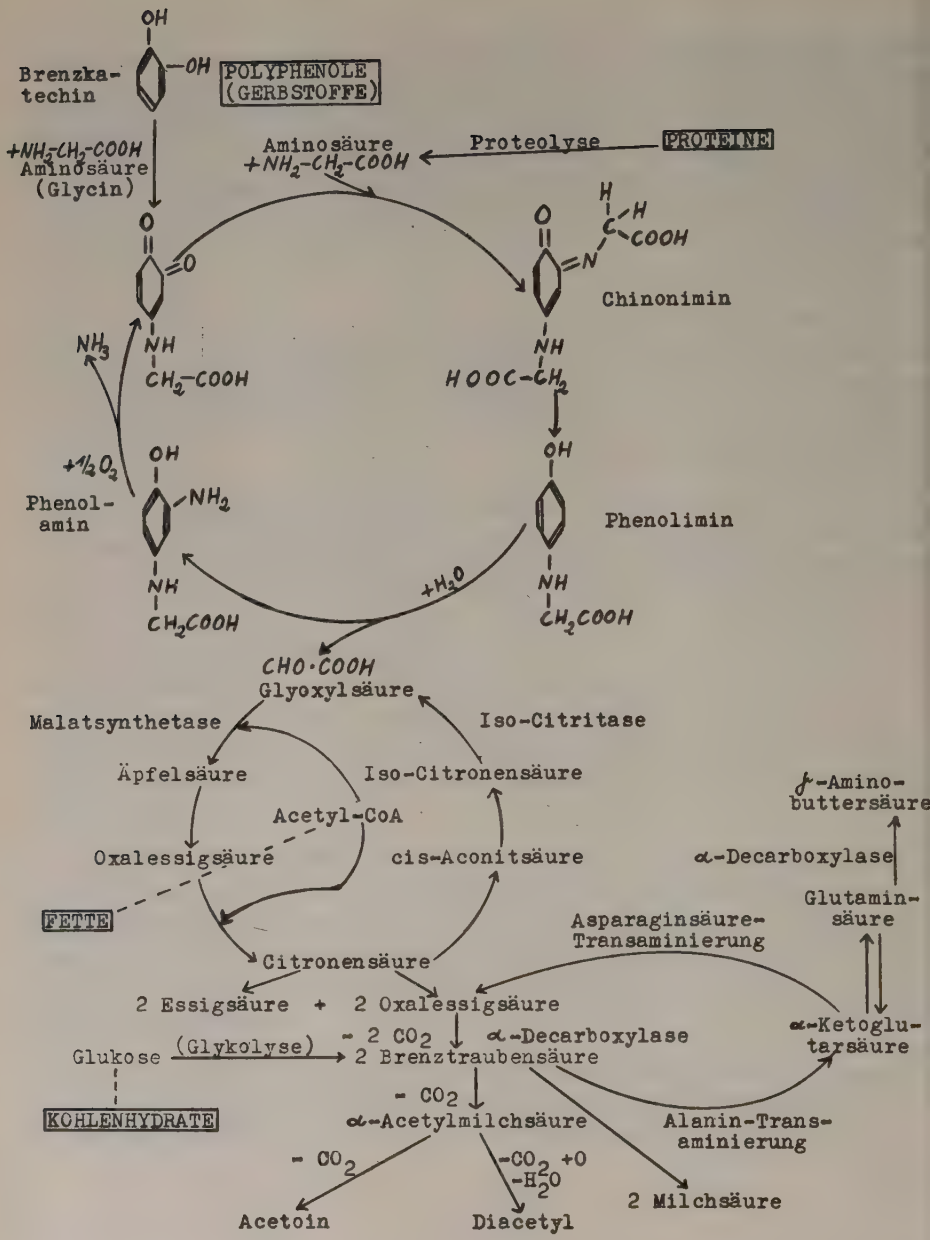
Auf Grund dieser Betrachtungsweise geht aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen der Kakaogerbstoffbildung und dem Citronensäurecyclus über die Glyoxylsäure hervor. Der verhältnismäßig hohe Gehalt an Citronensäure (o,5%) in frischen und fermentierten Kakaobohnen ist wohl auf diesen Cyclus zurückzuführen.

Die Voraussetzungen für den Ablauf solcher mit enzymatischen Abbauvorgängen gekoppelter chemischer Umsetzungen während der üblichen Aufbereitung des Rohkakaos sind hier erkannt worden.

Eine große Bedeutung dieser Kreisprozesse, bei denen das Coenzym A, bzw. dessen reaktionsbereite Acetylverbindung beteiligt ist, liegt in der Bildung von Aromastoffen. K. TÄUFEL und U. BEHNKE (48) berichten von der Entstehung der bekannten Geschmackskomponenten Diacetyl und Acetoin über den Citronensäurecyclus. H. SCHMALFUSS und H. BARTHMEYER (43a) konnten erstmalig Diacetyl und Acetoin im Kakao nachweisen und sehen diese Substanzen als einen wesentlichen Bestandteil des Kakaoaromas an.

Aus der Überlegung, daß die Reaktionskette der geschilderten Abbauvorgänge mit den oxydativen Kondensationsreaktionen der Gerbstoffanteile gekoppelt ist, wird gefolgert, daß diesen Reaktionscyclen die Steuerung der Aromavorstufen während der Fermentierung zugeschrieben werden kann.

Die nachfolgende schematische Darstellung veranschaulicht unsere Vorstellungen über die in der Kakaobohne während der Fermentierung möglicherweise ablaufenden gekoppelten Reaktionscyclen.


Brenzka-
techin
POLYPHENOLE
(GERBSTOFFE)
+NH2-CH2-COOH
Aminosäure
(Glycin)
Aminosäure
+NH2-CH2-COOH
Proteolyse
PROTEINE
Chinonimin
NH3
CH2-COOH
HOOC-CH2
+1/2 O2
Phenol-
amin
Phenolimin
+H2O
CHO·COOH
Glyoxylsäure
Malatsynthetase
Iso-Citritase
Äpfelsäure
Iso-Citronensäure
Acetyl-CoA
Oxalessigsäure
cis-Aconitsäure
FETTE
Citronensäure
2 Essigsäure + 2 Oxalessigsäure
- 2 CO2
α-Decarboxylase
Glukose
(Glykolyse)
2 Brenztraubensäure
KOHLENHYDRATE
- CO2
α-Acetylmilchsäure
- CO2
-CO2 +O
-H2O
Acetoin
Diacetyl
2 Milchsäure
Alanin-Trans-
aminierung
α-Ketoglu-
tarsäure
Asparaginsäure-
Transaminierung
α-Decarboxylase
Glutamin-
säure
γ-Amino-
buttersäure

C ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die Untersuchungen befassen sich mit Enzymstudien an ruhenden und keimenden Kakaobohnen. Das Ziel ist festzustellen, ob gekoppelte Reaktionen ablaufen und inwieweit die erworbenen Kenntnisse des Ineinandergreifens der Enzyme einen Einblick in die Bildung von Aromen oder Aromavorstufen gewinnen lassen.

Es werden Aktivitätsbestimmungen von Amylase, Proteinase, Lipase, alkalischer und saurer Phosphatase, Pektinesterase, Polygalakturonase, Katalase, Peroxydase, Polyphenoloxydase, α-Decarboxylase und Coenzym A in Kakaobohnen aus Ghana, Costarica und Bahia mit positiven Befunden durchgeführt. Erstmalig gelingt der Nachweis von Proteinase, Lipase, α-Decarboxylase und Coenzym A.

Besondere Beachtung findet die Polyphenoloxydase. Ihre Aktivität ist von der Herkunft der Bohnen abhängig und nimmt wie die der übrigen Enzyme während der Keimung zu. Der Zusatz von Aminosäuren und Peptiden nach der ersten Reaktionsstufe (Chinonbildung) mit Brenzkatechin als Substrat fördert die Sauerstoffaufnahme schwach. In Gegenwart von L-Prolin tritt nach Zugabe der erwähnten Eiweißabbauprodukte ein ausserordentlich hoher Sauerstoffverbrauch auf. Unter den Aminosäuren bewirkt Glycin die grösste zusätzliche Sauerstoffaufnahme, gefolgt von DL-Threonin, DL-Serin, L-Alanin und L-Lysin. Keinen Einfluss haben D-Arginin, L-Glutaminsäure und L-Leucin. Von den untersuchten Peptiden übt Glycyl-DL-Leucin den stärksten Einfluss auf die Sauerstoffaufnahme aus, während bei DL-Leucyl-Glycin keine Wirkung in dieser Hinsicht zu beobachten ist.

Der Nachweis von gekoppelten Reaktionen wird ausser am Beispiel der enzymatischen Polyphenoloxydation - Proteolyse, an denen der Transaminierung - Proteolyse und Transaminierung - Decarboxylierung geführt.

Die Reaktionen zwischen Eiweißabbauprodukten und Oxydationsprodukten der Polyphenole vermindern die Adstringens von Kakaoerzeugnissen. Die Kenntnis dieser Umsetzungen läßt ferner eine Wechselwirkung zwischen der Kakaogerbstoffbildung und dem Ablauf des Glyoxylsäurecyc-

lus erkennen. Das aufgefundene Coenzym A berechtigt zu dieser Annahme.

Die im Rahmen dieser Untersuchung festgestellte α-Decarboxylase hat die Fähigkeit aus Oxalessigsäure, u.a. ein Produkt des Glyoxylsäurecyclus, Brenztraubensäure zu produzieren, die ihrerseits der Ausgangsstoff für die enzymatische Bildung von Acetoin und Diacetyl ist.

Aus den Ergebnissen der bisherigen Versuche an unfermentierten Kakaobohnen wird gefolgert, daß diesen Reaktionscyclen die Bildung von Aromavorstufen während der Fermentierung zugeschrieben werden kann.

D ANORDNUNG DER VERSUCHE

Herstellung der Enzymsuspension:
Diese wird aus Keimlingen westafrikanischer Amelonado-Kakaobohnen durch Verreiben mit Wasser von 2°C im Verhältnis 1:1o hergestellt.

Gewinnung der Enzymextrakte:
Diese werden aus geschälten, ungekeimten und angekeimten Kakaobohnen durch Rührextraktion im Tourmix mit McIlvaine-Puffer, p_H 6,4 bei 2°C im Verhältnis 1:2 bei der Bestimmung der Polyphenoloxydase, mit Wasser im Verhältnis 1:1o bei der Aktivitätsmessung der Amylase, Proteinase, Lipase, Phosphatase, Pektinesterase, Polygalakturonase, Katalase und Peroxydase und anschliessendem Zentrifugieren bereitet.

Bereitung eines Acetontrockenpulvers aus unfermentierten, getrockneten Kakaobohnen:
Zur Verwendung gelangen 1oo Kakaobohnen = 86 g. Diese werden entschält, in einer Reibschale zerkleinert und mit Aceton im Verhältnis 1:6 3o Minuten extrahiert. Dann schliessen sich 2 weitere Extraktionen von je 3o Minuten im gleichen Verhältnis an, einmal mit einem Gemisch von Aceton-Äther wie 1:1, das andere Mal mit Äther allein. Das Gewicht des Pulvers nach der Extraktion beträgt 51 g. Das so erhaltene Acetontrockenpulver wird über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet.

Ausführung der Bestimmungen:

1) Lochtest-Methode

nach J. DINGLE, W.W. REID und G.L. SOLOMONS (11)
1 g Pronagar (Agar-agar) wird in 5o ml Wasser über Nacht eingeweicht. Nach Zusatz von o,5 g Substrat und 1o ml Pufferlösung wird die Mischung aufgekocht, bis eine hellbraune, trübe Flüssigkeit entsteht. Zur Vermeidung von Pilzwachstum werden 1o mg Salicylanilid zugefügt. Nach dem Auffüllen auf 1oo ml erfolgt die Überführung in Petrischalen (4 mm Schichthöhe). Es bildet sich eine feste Gallerte. Mit Hilfe eines Korkbohrers lassen sich aus ihr kleine Blöckchen von 8 mm Durchmesser ausheben, in die die zu bestimmenden Enzymlösungen ein-

pipettiert werden. Die abgedeckten Schalen werden bei 37°C 24 Stunden belassen, danach mit dem "Entwickler" übergossen und dieser nach 15 Minuten entfernt.

a) Amylase - Das Substrat ist lösliche Stärke in o,2mMcIlvaine-Puffer (Citronensäure-Dinatriumphosphat), p_H 4,5. Die Entwicklung erfolgt mit o,olnJodlösung. Es bilden sich farblose Zonen auf blauem Untergrund. (Versuchsansatz Abb. 1)

b) Proteinase - Das Substrat ist Gelatine in McIlvaine-Puffer, p_H 4,5. Die Entwicklung erfolgt mit 2o%iger Sulfosalicylsäure. Es bilden sich klare Zonen auf der Gelfläche. (Versuchsansatz Abb. 2)

c) Lipase - Das Substrat ist Kokosfett in Acetatpuffer, p_H 4,5. Die Entwicklung erfolgt mit 1o%iger Kupferacetatlösung. Es entsteht eine intensive blaugrüne, trübe Färbung. Diese rührt von einem Kupfer-Komplex her, der sich mit den freigesetzten Fettsäuren bildet.(Versuchsansatz Abb. 3)

d) Phosphatase - Das Substrat ist Phenolphthaleindiphosphat in Acetatpuffer, p_H 5,o, bzw. Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer, p_H 9,o. Die Entwicklung erfolgt mit Ammoniakdämpfen. Es bilden sich rotgefärbte Zonen von freiem Phenolphthalein. (Versuchsansatz Abb. 4)

e) Pektinesterase - Das Substrat ist Pektin in Acetatpuffer, p_H 4,5, o,5% Calciumacetat enthaltend. Die Entwicklung erfolgt mit 1o%iger Kupferacetatlösung. Man erhält klare Zonen auf opalescierenden Untergrund.

f) Polygalakturonase - Das Substrat ist Natriumpektat in o,2nPhosphatpuffer, p_H 5,3. Zur Bindung der Calciumionen werden o,5% Ammoniumoxalat zugefügt. Die Entwicklung erfolgt mit 5nHCl. Es bilden sich opalescierende Kreisflächen.

2) Manometrische Bestimmung der Pektinesterase

nach F. KIERMEIER (27)
Die üblichen Bestimmungsmethoden, die entweder auf einer alkalischen

Titration der freiwerdenden Carboxylgruppen (22) oder einer Erfassung der Methoxylgruppen beruhen (32), sind bei geringen Mengen des Fermentes kaum anwendbar. Nach F. KIERMEIER (27) ist es wie bei der Bestimmung von Esterasen möglich, die Aktivität manometrisch in der Warburg-Apparatur zu messen. Als Substrat dient Pektin. Die bei der Esterspaltung freiwerdende Säure setzt aus einer Bicarbonatlösung die aequivalente Menge CO_2 frei, welche volumetrisch erfasst wird. Die Messung erstreckt sich nur auf die Anfangsgeschwindigkeit. Daher gelten die ersten 5 Minuten der Reaktion als begrenzender Faktor. (Versuchsansatz Abb. 5)

3) Viskosimetrische Bestimmung der Polygalakturonase

nach Q. LANDIS und S. REDFERN (31)

Es ist vor allem die von R. WILLSTÄTTER und G. SCHUDEL beschriebene Methode (54), die allgemeine Anwendung findet. Sie beruht auf der Zunahme des Reduktionsvermögens. Es ist jedoch notwendig, eine Methode heranzuziehen, die es ermöglicht, auch über geringere Aktivitäten eine Aussage zu machen. Für diese Zwecke bietet sich das viskosimetrische Untersuchungsverfahren an, bei dem Aktivität von Enzymen auf Grund der Viskositätsabnahme der Substratlösung beurteilt wird. Diese Methode ist sehr empfindlich und daher besonders für die Verfolgung kleiner Aktivitäten geeignet. Für die Aussagen über die Aktivitäten, die auf Grund der Viskositätsmessungen gemacht werden, sind zwei Wege gebräuchlich: Einmal durch Angabe der Abbauzahl nach F. WEBER und H. DEUEL (53) zum anderen durch Angabe der relativen Viskosität. Beide Bewertungen sind keine Absolutwerte. Die Abbauzahl (A) stellt die Abnahme der spezifischen Viskosität η(spez.) in Prozent der spezifischen Viskosität der unabgebauten Pektinlösung dar. Demgegenüber bezeichnet die "relative Viskosität" (P) die nach der Einwirkungszeit t verbliebene spezifische Viskosität in Prozent der spezifischen Viskosität der unabgebauten Pektinlösung.

$$A = \frac{ta - t}{ta - to} \times 100 \qquad p = \frac{t - to}{ta - to} \times 100$$

η = absolute Viskosität der Pektinlösung
η_o = absolute Viskosität des Lösungsmittels
t_a = Ausflusszeit der Pektinlösung
t = Ausflusszeit der Pektinlösung nach t Minuten
t_o = Wasserwert

Die Viskositätsmessungen werden in einem von Q. LANDIS und S. REDFERN (31) abgeänderten Ostwald-Viskosimeter durchgeführt. Dieses besitzt statt der unteren offenen Kugel ein belüftbares offenes Glasrohr als Kapillaren-Fortsatz. Es wird von einem Glasmantel umgeben, der von dem gleichen Thermostaten beheizt wird, in welchem die Lösung temperiert wird. Zur Viskositätsmessung wird der Fortsatz in die Lösung getaucht, diese angesaugt und die Auslaufzeit gemessen. Da Lösung und Viskosimeter stets die gleiche Temperatur besitzen, die Lösungen schnell gewechselt werden können und das Viskosimeter leicht zu reinigen ist, kann eine grosse Anzahl von Bestimmungen in kurzer Zeit durchgeführt werden. Zwischen Lösung und frisch gereinigtem Viskosimeter besteht nur ein sehr geringer Unterschied, der schon bei der zweiten Messung ausgeglichen wird.
(Versuchsansatz Tabelle VI)

4) Manometrische Bestimmung der Katalase

nach A.M. ALTSCHUL, M.L. KARON und L. KYAME (1)
Bei der Bestimmung der Katalase in rohen Pflanzenextrakten liefern die allgemein üblichen Methoden durch Titration oder spektrophotometrische Messungen zweifelhafte Ergebnisse, weil H_2O_2 in Nebenreaktionen verbraucht wird oder weil durch Verunreinigungen ein an sich nicht vorhandenes Reduktionsvermögen vorgetäuscht wird. Die manometrische Bestimmung nach A.M. ALTSCHUL, M.L. KARON und L. KYAME (1) vermeidet diese Fehler.
(Versuchsansatz Abb. 6)

5) Massanalytische Bestimmung der Peroxydase

nach A. PURR (39)

Zu 4,o ml n/2o Ascorbinsäurelösung = 17,6 mg l-Ascorbinsäure fügt man lo,o ml Pufferlösung (p_H 5,o), 5 ml n/lo Wasserstoffperoxydlösung beide auf 25°C angewärmt, 1,o ml o,5%ige o-Tolidin - und Enzymlösung hinzu, stoppt die Zeit, füllt mit auf 25°C angewärmtem, destilliertem Wasser auf 5o ml auf und beläßt das Gemisch bei 25°C im Thermostaten. Nach Ablauf der Bestimmungsdauer von 3o Minuten unterbricht man in lo ml des Ansatzes die Reaktion, indem man die Analysenprobe unter Umschütteln in einen Kolben hineinpipettiert, in welchem sich 2,5 ml 2n Schwefelsäure befinden und titriert nach Zugabe von 8-lo Tropfen 1%iger Stärkelösung als Indikator die noch vorhandene Menge Ascorbinsäure mit n/25o Jodlösung.

Erforderliche Lösungen:

1. Pufferlösung p_H 5,o; hergestellt durch Auflösen von 18 g Phosphat-Citronensäure-Trockenpuffer (p_H 5,o) und 2 g Phosphat-Oxalsäure-Trockenpuffer (p_H 5,o) in 25o ml Wasser.
Herstellung des Trockenpuffers: 3,67 g sek. Natriumphosphat werden in einer Porzellanschale mit 2,o38 g Citronensäure bzw. 3,563 g Natriumphosphat und 1,28 g Oxalsäure vermengt und über einem Drahtnetz mit kleiner, offener Flamme bei 14o°C unter Rühren mit dem Glasstab zum Schmelzen gebracht und solange erhitzt, bis das Kristallwasser entwichen ist. Danach wird der Schmelzkuchen bei 13o°C 3 Stunden im Trockenschrank belassen und dann pulverisiert.
2. n/2o l-Ascorbinsäure: 44o mg l-Ascorbinsäure mit lo ml obiger Pufferlösung versetzt und auf loo ml aufgefüllt.
3. n/lo Wasserstoffperoxyd: o,567 g 3o%ige Wasserstoffperoxydlösung mit einigen Tropfen nNaOH auf p_H 5,o eingestellt und mit lo ml der obigen Pufferlösung versetzt, mit Wasser auf loo ml aufgefüllt.
4. o,5%ige o-Tolidinlösung: Herstellung einer 1%igen Lösung in 96%igem Alkohol und Zufügen der gleichen Menge Wasser.
(Versuchsansatz Abb. 7)

6) Manometrische Bestimmung der Polyphenoloxydase

Verschiedene Methoden zur Messung der Oxydase-Aktivität sind bekannt. Kolorimetrische Bestimmungen, die zwar für qualitative Teste geeignet sind, scheiden wegen ihres Mangels an Reproduzierbarkeit für quantitative Messungen aus. Im Rahmen dieser Arbeit wird von der manometrischen Methode nach Warburg Gebrauch gemacht und diese zur Aktivitätsbestimmung herangezogen. (Versuchsansatz Abb. 8-12)

Bestimmung der Sauerstoffaufnahme bei Zusatz von Aminosäuren bzw. Peptid:
Nach Ablauf von 3o Minuten erfolgt der Zusatz von o,5 ml o,2 m Aminosäure-bzw. Peptidlösung über das Seitengefäss.

Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von L-Prolin bei Zusatz von Aminosäuren, Peptid bzw. von Proteinen (Zein):
Ansatz wie oben mit o,5 ml o,o2m L-Prolinlösung im Hauptgefäss.
Nach Ablauf von 3o Minuten erfolgt der Zusatz von o,5 ml o,2m Aminosäure-oder Peptid-bzw. 5%iger Zeinlösung über das Seitengefäss.

7) Manometrische Bestimmung der α-Decarboxylase

nach O. SCHALES und S.S. SCHALES (43)
Die Extrakte werden durch Zerkleinern von Kakaobohnen im Tourmix mit o,o67m Phosphatpuffer p_H 5,75 im Verhältnis 1:2 und anschliessendem Zentrifugieren hergestellt. (Versuchsansatz Tabelle XI und XII)

8) Spektrophotometrische Bestimmung des Coenzym A

nach N.O. KAPLAN und F. LIPMANN (26)
Alle Bestimmungen beruhen auf enzymatischen Reaktionen. Unter den katalytischen Testmethoden eignet sich besonders die Acetylierung von Sulfanilamid nach N.O. KAPLAN und F. LIPMANN (26) wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit, aber auch wegen der Möglichkeit, rohe Gewebsextrakte auf ihren CoA-Gehalt zu untersuchen. Als Enzymmaterial dient ein Taubenleberextrakt, in dem das ursprünglich vorhandene Coenzym A durch Alterung zerstört worden ist, so dass nur nach Zugabe von neuem Coenzym A Sulfanilamid acetyliert werden kann.

N.O. KAPLAN und F. LIPMANN (26) definieren diejenige Menge Coenzym A als Einheit, die eine "halbmaximale Acetylierung" bewirkt. Das acetylierende Agens ist Acetyl-CoA, welches aus Acetat und Coenzym A unter Mitwirkung von Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird.

Acetat + CoASH + ATP ⟶ Acetyl-SCoA + AMP + PP
Acetyl-SCoA + Sulfanilamid ⟶ Acetyl-Sulfanilamid + CoASH

ATP + Acetat + Sulfanilamid $\xrightarrow{\text{CoASH}}$ Acetyl-Sulfanilamid + AMP + PP

Eine analytische Erfassung des Umsatzes gestattet die Farbreaktion des nicht acetylierten Sulfanilamids mit einem Amin durch Diazotierung nach A.C. BRATTON und E.K. MARSHALL (7). Nach J.D. GREGORY, G.D. NOVELLI und F. LIPMANN (17) gilt die Beziehung:

1 mg CoA = 413 LIPMANN-Einheiten
1 Mμ CoA = 316 " "

Herstellung eines Acetontrockenpulvers aus Taubenleber:
Sechs Tauben werden durch Decapitierung getötet und vollständig ausgeblutet. Die zuvor eingefrorene Leber wird im Tourmix bei -15°C mit dem zwanzigfachen ihres Gewichtes an kaltem Aceton 2 Minuten lang homogenisiert. Nach dem Abfiltrieren des Homogenates auf einem Büchnertrichter und dem Waschen des Rückstandes mit Aceton und Äther erfolgt die Trocknung des Pulvers im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd. Das Bindegewebe wird mit Hilfe eines Siebes DIN 24 entfernt und das rosafarbene Pulver bei -15°C aufbewahrt.

Bereitung des Enzyms zur Acetylierung aus Taubenleber-Acetontrockenpulver:
1 g Leberpulver wird mit 10 ml 0,02 m eiskaltem Kaliumbicarbonat verrieben, bis eine Suspension entsteht und der unlösliche Rückstand abzentrifugiert (20 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute). Nach dem Einfrieren der dunkelroten, leicht opalisierenden überstehenden Flüssigkeit (über Nacht bei -10°C) erfolgt am nächsten Tag das Auftauen der Lösung. Diese wird 4 Stunden bei Raumtemperatur zur Inaktivierung belassen, der Extrakt zentrifugiert - 1 Stunde bei 5000 und 1 Stunde bei 15000 Umdrehungen pro Minute - und der Niederschlag verworfen. Der gealterte Extrakt ist eine rötliche

wasserklare Lösung und findet für die Bestimmung Verwendung.

Reagenzien:

1) Standard-Sulfanilamidlösung:
   5,6 ml o,o2m Sulfanilamid
   6,25 ml m Natriumacetat
   2o,o ml o,o5m Natriumadenosintriphosphat (ATP)
   25,o ml o,2 m Natriumcitrat
   69,4 ml Wasser
2) o,2m Cysteinhydrochlorid

Die Mischung 1) und die Lösung 2) werden bei - 15°C eingefroren und erst vor Gebrauch aufgetaut.

3) m Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), p_H 8,o - 8,4
4) 5% Trichloressigsäure
5) o,1% Natriumnitrit, täglich frisch hergestellt
6) o,1% N(1-naphthyl) äthylendiamindihydrochlorid, täglich frisch hergestellt
7) o,5% Amidosulfonsäureamid
8) o,2n HCl
9) Standard CoA

Ausführung der Acetylierung:

1) o,3 ml Standard CoA oder zu analysierende Lösung (wechselnde Mengen Kakaobohnenextrakt)
2) 1,5 ml Wasser
3) o,15 ml m Trispuffer
4) o,5 ml o,2m Cysteinhydrochlorid
5) o,5 ml Standard-Sulfanilamidlösung
6) o,3 ml Taubenleberenzym-Lösung
7) Incubation der Gefäße in einem Wasserbad, 1,5 Stunden bei 37°C. Als Gefäße dienen Reagenzgläser von 1 - 1,3 cm Durchmesser. Durch Hinzufügen von 4,o ml 5%iger Trichloressigsäure wird die Reaktion gestoppt.
8) Die ausgefällten Proteine werden abzentrifugiert, lo Minuten bei 12ooo Umdrehungen pro Minute.

Bestimmung des nicht acetylierten Sulfanilamids nach A.C. BRATTON und E.K. MARSHALL (7):

1) 1 ml der überstehenden Flüssigkeit wird abpipettiert und in einen 25 ml Erlenmeyer-Kolben, der in Eiswasser steht, übergeführt. Dann werden 1o,o ml o,2n HCl zugefügt.
2) Nach Zugabe von 1,o ml o,1%iger Natriumnitritlösung schüttelt man gut um und lässt 3 Minuten im Eiswasser stehen.
3) Nach Zufügen von 1,o ml o,5%iger Amidosulfonsäureamid-Lösung wird zur Zerstörung des an den Wänden haftenden Nitrits gut gemischt und 2 Minuten stehen gelassen.

Die Messung der Extinktion erfolgt bei 54o mμ.

Herstellung eines Kochsaftes von Kakaobohnen nach E. SEIFTER (44): Eine abgewogene Menge Kakaobohnen homogenisiert man mit der gleichen Menge Wasser von 8o°C 2 Minuten im Tourmix. Nach einer Kochzeit von 5 Minuten erfolgt das Zentrifugieren, 2o Minuten bei 4ooo Umdrehungen pro Minute. Die überstehende Lösung wird wie vorstehend beschrieben auf ihren CoA-Gehalt untersucht und das Sediment so oft weiter extrahiert, bis kein CoA mehr nachweisbar ist.

E LITERATURVERZEICHNIS

1) ALTSCHUL A.M., M.L.KARON und L.KYAME, Arch. Biochem. 18,161(1948)
2) BACH A., A.OPARIN und R.WÄHNER, Biochem.Z. 18o,363(1927)
3) BALLS A.K. und S.R.HOOVER, J.biol.Chemistry 121,737(1937)
4) BIEHL B., Gordian 55,17(1955)
5) BIEHL B., Dissertation Universität Hamburg 1958
6) BIRCH H.F. und E.C.HUMPHRIES, 8 Am.Rep.Cacao Res.Trinidad 1959, S.4o
7) BRATTON A.C. und E.K.MARSHALL, J.biol.Chemistry 128,537(1939)
8) BRILL H.O., Philippine J.Sci. 1o,123(1915)
9) CIFERRI C., J.Dept.Agr.Puerto Rico 15,223(1931)
1o) DEWITT K.W., Rep.Cacao Research,Trinidad, 1945-1951,S.114
11) DINGLE J., W.W.REID und G.L.SOLOMONS, J.Sci.Food Agric.4,149(1953)
12) FORSYTH W.G.C., Biochem.J.51,511(1952)
13) FORSYTH W.G.C., Biochem.J.6o,1o8(1955)
14) FORSYTH W.G.C. und V.C.QUESNEL, J.Sci.Food Agric.8,5o5(1957)
15) FORSYTH W.G.C. und V.C.QUESNEL, Biochem.J.65,177(1957)
16) FORSYTH W.G.C., V.C.QUESNEL und J.B.ROBERTS, J.Sci.Food Agric. 9,181(1958)
17) GREGORY J.D., G.D.NOVELLI und F.LIPMANN, J.Am.Chem.Soc.74,854 (1952)
18) GRIFFITHS L.A., Nature(London) 18o,1373(1957)
19) GUSSEWA A.R. und M.G.BORICHINA, Biochimija(Moskau) 23,291(1958)
2o) HERTZ W.J. und R.S.SHALLENBERGER, Food Research 25,491(196o)
21) HESS E.H., Arch.Biochem.74,198(1958)
22) HILLS C.H., J.W.WHITE und G.L.BAKER, Proc.Inst.Food Techn.47(1942)
23) HOLDEN M., J.Sci.Food Agric.1o,691(1959)
24) JACKSON H. und L.P.KENDAL, Biochem.J.44,477(1949)
25) JANSEN E.F., L.R.MACDONNAL und R.JANG, Arch.Biochem.8,113(1945)
26) KAPLAN N.O. und F.LIPMANN, J.biol.Chemistry 174,37(1948)
27) KIERMEIER F., Liebigs Ann.Chem.551,232(1949)
28) KORNBERG H.L. und H.BEEVERS, Nature 18o,35(1957)
29) KORNBERG H.L. und H.BEEVERS, Biochem.Biophys.Acta 26,531(1957)

30) KURSANOW A.L., Synthese und Umwandlung der Gerbstoffe in der Teepflanze, Berlin 1954, VEB-Verlag Volk und Gesundheit
31) LANDIS Q. und S.REDFERN, Cereal Chem.24,157(1947)
32) LINEWEAVER H. und E.F.JANSEN, Advances in Enzymology,New York 1951,Vol.XI,S.267
33) MASON H.S., Advances in Enzymology, New York 1955, Vol.XVI, S.105
34) NELSON J.M. und C.R.DAWSON, Advances in Enzymology, New York 1946, Bd.IV,S.99
35) NEUBERG C. und J.KARCZAG, Biochem.Z.36,60(1911)
36) NEUBERG C. und J.KERB, Biochem.Z.47,405(1912)
37) POLLARD A., M.E.KIESER und D.J.SISSONS, Chem.and Ind.1958,952
38) POPOW W.R., Biochimija(Moskau), 6,124(1950)
39) PURR A., Biochem.Z.321,1(1950)
40) ROHRLICH M. und R.RASMUS, Wiss.Müllerei 1955,S.89
41) RUSOFF J.J., U.S. Patent 2,835,590,May 20,1958
42) SCHALES O. und S.S.SCHALES, Arch.Biochem.11,445(1946)
43) SCHALES O. und S.S.SCHALES, Arch.Biochem.69,378(1957)
44) SEIFTER E., Plant Physiology 29,403(1954)
45) SCHUBIGER G.F., E.ROESCH und R.M.EGLI, Fette und Seifen, 59,631(1957)
46) STREET H.E., Advances in Enzymology, Vol.IX,New York, 1949,S.391
47) SUZUKI Y., Naturwissenschaften 44,514(1957)
48) TÄUFEL K. und U.BEHNKE, Ernährungsforschung 4,1(1959)
49) TRAUTNER E.M. und E.A.H.ROBERTS, Austral.J.Sci.Res.3,356(1950)
50) VIRTANEN A.J., Angew.Chem.67,384(1955)
51) WADSWORTH R.W. und G.R.HOWAT, Nature(London) 174,392(1954)
52) WADSWORTH R.W. und G.R.HOWAT, Rep.Cocoa Conference,London 1955, S.131
53) WEBER F. und H.DEUEL, Mitt.Geb.Lebensmitt.und Hyg.36,368(1945)
54) WILLSTÄTTER R. und G.SCHUDEL, Ber.dtsch.chem.Ges.51,780(1918)
55) WIELAND Th. und H.WIEGANDT, Angew.Chem.67,399(1955)
56) ZALESKI W. und E.MARX,Biochem.Z.47,184(1912)
57) ZALESKI W. und E.MARX,Biochem Z.48,175(1913)
43a) SCHMALFUSS H. und H.BARTHMEYER, Zeitschr.f.Lebensm.Unters.u. Forsch.63,283(1932)

L e b e n s l a u f

Am 8. Juni 1931 in Ratibor als Sohn des Lehrers Theodor Morcinek und seiner Ehefrau Margarete, geb. Rögner, geboren, besuchte ich von 1937 - 1941 die Volksschule in Schomberg(Oberschlesien) und anschliessend bis 1945 die Städtische Oberschule für Jungen in Beuthen. Den auf Grund der Kriegsereignisse unterbrochenen Schulbesuch setzte ich 1946 an der Staatlichen Oberschule in Stadthagen (Schaumburg-Lippe) fort und legte dort im Februar 1951 die Reifeprüfung ab.

Es folgten vom Sommer-Semester 1951 bis zum Sommer-Semester 1957 an den Universitäten Erlangen und München das Studium der Lebensmittelchemie, im Juni 1955 die lebensmittelchemische Vorprüfung und im November 1957 die Hauptprüfung.

In den Jahren 1958 - 1961 war ich mit der Ausführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V., München, beschäftigt.